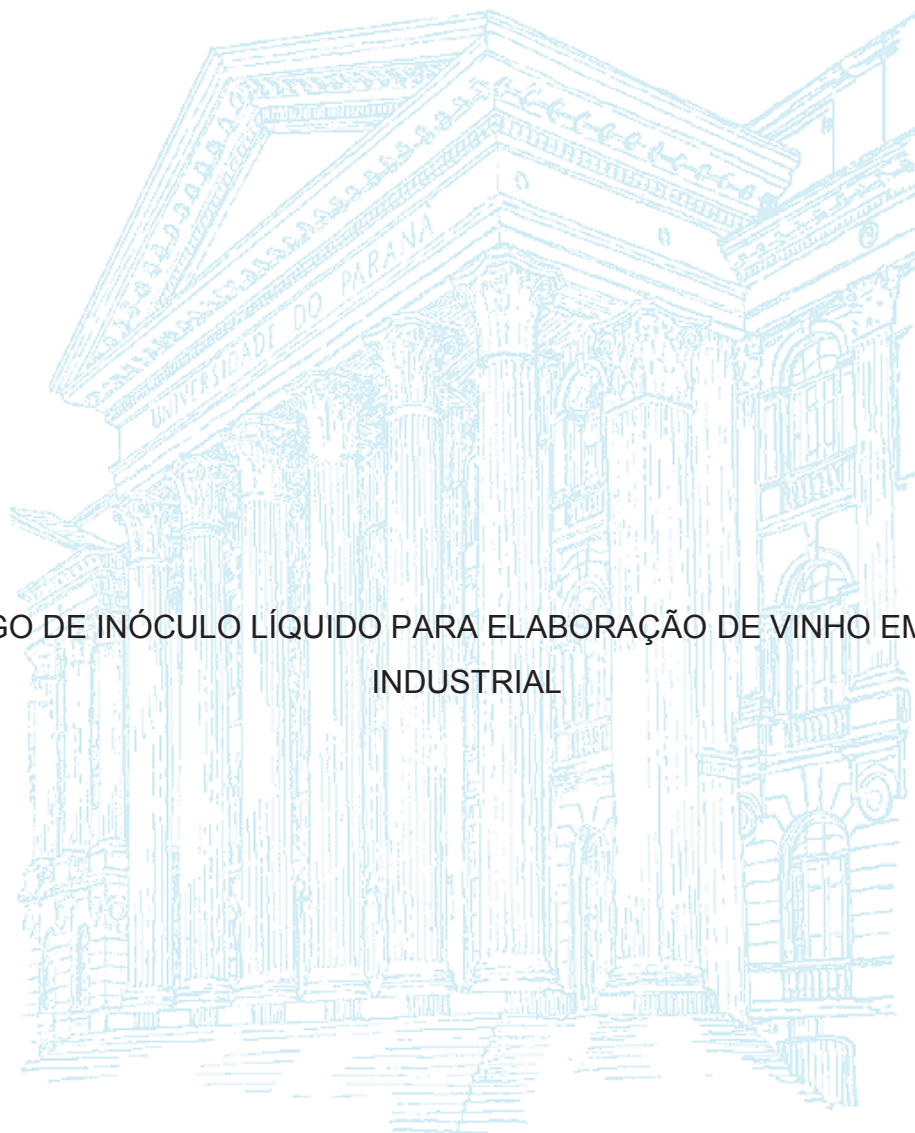


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CINTIA STADTLOBER ROMPKOVSKI

EMPREGO DE INÓCULO LÍQUIDO PARA ELABORAÇÃO DE VINHO EM ESCALA  
INDUSTRIAL



CURITIBA

2019

CINTIA STADTLOBER ROMPKOVSKI

EMPREGO DE INÓCULO LÍQUIDO PARA ELABORAÇÃO DE VINHO EM ESCALA  
INDUSTRIAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Tania Maria Bordin Bonfim  
Coorientadoras: Dr<sup>a</sup> Bruna Carla Agustini e  
Dr<sup>a</sup> Debora Brand

CURITIBA

2019

Rompkowski, Cintia Stadtlober

Emprego de inóculo líquido para elaboração de vinho em escala industrial [recurso eletrônico] / Cintia Stadtlober Rompkovski – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientadora: Professora Dra. Tania Maria Bordin Bonfim

Coorientadora: Dra. Bruna Carla Agustini

Coorientadora: Dra. Debora Brand

1. Vinho. 2. Inóculo. 3. Escala laboratorial. 4. Escala industrial. I. Bonfim, Tania Maria Bordin. II. Agustini, Bruna Carla. III. Brand, Debora. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 663.2



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
FARMACÉUTICAS - 40001018042P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designado pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de CINTIA STADTLÖBER ROMPKOVSKI intitulada: **EMPREGO DE INÓCULO LÍQUIDO PARA ELABORAÇÃO DE VINHO EM ESCALA INDUSTRIAL**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 21 de Fevereiro de 2019.

TANIA MARIA BORDIN BONFIM

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ROSSANA CÁSSARI DOS SANTOS

Avaliador Externo (UFPR)

HELAYNE APARECIDA MAIEVS

Avaliador Externo (UFPEL)

Para Davi e Alícia.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Paraná e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e a seus professores pelo aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

À orientadora Prof<sup>a</sup> Tania Maria Bordin Bonfim da Universidade Federal do Paraná, por todo o apoio, compreensão e ensinamentos práticos e teóricos transmitidos. Agradeço por me ensinar a escrever cientificamente. Sempre soube entender meu lado pessoal e sempre se preocupou com o bem-estar de minha família. Pessoa de uma imensa bondade, tem grande dedicação aos seus alunos, um exemplo de caráter.

À coorientadora Dr<sup>a</sup> Bruna Carla Agustini por todo o auxílio e conhecimento transferido. Agradeço imensamente por ter me acolhido com todo o carinho na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Uva e Vinho.

À coorientadora Prof<sup>a</sup> Debora Brand da Universidade Federal do Paraná agradeço a experiência repassada, colaboração e assistência no laboratório.

Ao pessoal da Central analítica da Universidade Federal do Paraná, Ms. Maria das Graças e Dr. Maurício Passos pelo acompanhamento das análises de cromatografia líquida de alta eficiência.

Aos vitivinicultores do estado do Paraná, especialmente o Sr. Fernando Camargo, pelo incentivo e custeio de todos os insumos utilizados na elaboração dos vinhos em escala industrial.

Ao Pesquisador da Embrapa Uva e Vinho Dr. Gildo Almeida da Silva, por proporcionar os meios para o desenvolvimento de parte deste trabalho.

À colega Flavia Deffert pelo aprimoramento das ilustrações deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Enzimologia e Tecnologia de Fermentações da Universidade Federal do Paraná, Andre Gaspar Zinco, Nayara Caroline Silva, Juliane Santos Rodrigues, Lilian Akemi Coelho da Cruz Kawano, Suzana Marcovicz Follador, Marcio Augusto Batista, Caroline Giroto Pinto, Giulia Hoffmann Ribani, Mariana Camargo Lourenço, pela convivência diária.

Ao meu pai, que sempre me deu suporte em tudo o que precisei, para que eu pudesse estudar, inclusive cuidando de meus filhos quando eu estava na Universidade.

À minha mãe, que além de também cuidar das crianças enquanto eu não estava em casa, me incentivou a ingressar no Mestrado, e sempre me apoiou. Professora de Português e Dr<sup>a</sup> em Educação, com toda a sua experiência, contribuiu para o refinamento de toda a escrita da dissertação, deixando o texto com uma leitura mais agradável.

Ao meu marido Alexandre, agradeço o apoio, compreensão, incentivo e orgulho de ver minha evolução. Agradeço também a dedicação com nossos filhos enquanto eu estava ausente.

Aos meus anjinhos Davi e Alícia, meus filhos amados, que um dia vão entender que fiz tudo isso por eles.

“O vinho molha e tempera os espíritos e acalma as preocupações da mente... ele reaviva nossas alegrias e é óleo para a chama da vida que se apaga. Se você bebe moderadamente, em pequenos goles de cada vez, o vinho gotejará em seus pulmões como o mais doce orvalho da manhã... assim, então, o vinho não viola a razão, mas sim nos convida gentilmente a uma agradável alegria.”

(Sócrates)



## RESUMO

A vinicultura é uma importante atividade econômica brasileira. De 2016 para 2017, a produção de vinhos no Brasil cresceu 169%, e isso elevou o País à 14ª posição no ranking mundial dos países produtores de vinhos. A produção de vinhos no Brasil utilizando *Vitis labrusca* ou *Vitis bourquina* gira em torno de 80%. Nos processos de vinificação, as leveduras não-*Saccharomyces* quando utilizadas como inóculo, são descritas como iniciadoras da fermentação, porém é necessária a inoculação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para que a fermentação se complete. O emprego de leveduras não-*Saccharomyces* na produção de vinho, tem aumentado em razão de suas contribuições positivas para a qualidade do vinho. O objetivo deste estudo foi utilizar inóculo líquido da levedura autóctone *Hanseniaspora uvarum* (certidão de cadastro no Sisgen nº A40D67A) como insumo para elaboração de vinho tinto de mesa seco em escala industrial, a partir de uvas *Vitis labrusca* cultivar Bordô. Os inóculos foram preparados a partir das células da levedura conservadas por congelamento, anteriormente isoladas de uvas *Vitis labrusca* cultivar Bordô do estado do Paraná, nas escalas laboratorial e industrial. Na vinícola, foram elaborados vinhos tintos secos em tanques de fermentação de aço inox de 15.000 L e 25.000 L com 12 e 22 toneladas de uvas, respectivamente. Durante o processo de vinificação coletaram-se amostras das etapas laboratorial e industrial do preparo do inóculo e do tanque de fermentação para isolamento e identificação das leveduras por PCR-RFLP e PCR-RAPD. Nos vinhos elaborados analisaram-se os parâmetros enológicos convencionais, seguindo a metodologia do Manual de Métodos e Análises de Bebidas e Vinagres do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de 2005, compostos voláteis e resveratrol, por cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência, respectivamente. Os resultados demonstram que os vinhos elaborados estão de acordo com a Instrução Normativa nº 14, de 08 de fevereiro de 2018 - Complementação de Padrões de Identidade e Qualidade de Vinho e Derivados da Uva e do Vinho, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. No inóculo desenvolvido em escala laboratorial confirmou-se a presença da levedura *Hanseniaspora uvarum* e no final da fermentação em escala industrial, identificou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Ao se ampliar a escala de produção, obtiveram-se resultados diferentes dos conseguidos em escala laboratorial.

Palavras-chave: Levedura vínica. Escala laboratorial. Escala industrial. Inóculo. Vinho de mesa.

## ABSTRACT

Winemaking is an important economic activity in Brazil. From 2016 to 2017, wine production in Brazil grew 169%, and this mark has brought the country to the 14th place in the world ranking of wine producing countries. Around 80% of the wine production in Brazil uses *Vitis labrusca* or *Vitis bourquina* grapes. In wine-making processes, non-*Saccharomyces* yeasts, when used as an *inoculum*, are described as fermentation initiators, but the inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts is necessary for the fermentation process to be complete. The use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production has increased due to its positive contributions to the quality of the wine. The objective of this study was to use a liquid *inoculum* of the yeast *Hanseniaspora uvarum* (certificate of registration in Sisgen no. A40D67A) as an input to produce red dry table wine on an industrial scale made from grapes *Vitis labrusca* (Bordô grapes). The *inocula* were prepared from the yeast cells preserved by freezing, previously isolated from grapes *Vitis labrusca* – Bordô - from the state of Paraná, on both laboratory and industrial scale. At the winery, red dry table wines were made in stainless steel fermentation tanks of 15,000 L and 25,000 L with 12 and 22 tons of grapes, respectively. During the winemaking process, samples of the laboratory and industrial stages of *inoculum* and tank preparation were collected for the isolation and identification of yeasts by PCR-RFLP and PCR-RAPD. In the formulated wines, the conventional winemaking parameters were analyzed following the methodology of the Manual of Methods and Analysis of Beverage and Vinegars of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply of 2005, volatile compounds and resveratrol were analyzed by gas chromatography and high-performance liquid chromatography, respectively. The results showed that the wines produced are in accordance with the Normative Instruction No. 14, of February 8, 2018 - Complementation of Standards of Identity and Quality of Wine and Grape and Wine Derivatives, of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. In the *inoculum* developed in laboratory scale, the presence of yeast *Hanseniaspora uvarum* was confirmed, and at the end of a fermentation process on an industrial scale, *Saccharomyces cerevisiae* yeast was identified. By expanding the production scale, different results than those obtained on a laboratory scale were achieved.

Key-words: Wine yeast. Laboratory scale. Industrial scale. Inoculum. Table wine. Common wine.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - RESPIRAÇÃO CELULAR E FERMENTAÇÃO EM CÉLULAS DE LEVEDURAS.....	27
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA FORMAÇÃO DE SUBPRODUTOS NA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA .....	28
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA SIMPLIFICADA DA FORMAÇÃO DE ÉSTERES EM LEVEDURAS.....	31
FIGURA 4 - ESTRUTURAS DO <i>TRANS</i> -RESVERATROL (2D e 3D).....	32
FIGURA 5 - ESTRUTURAS DO <i>CIS</i> -RESVERATROL (2D e 3D).....	32
FIGURA 6 - BIOSÍNTESE DO RESVERATROL.....	33
FIGURA 7 - ESTRUTURA DE REPETIÇÃO DO rDNA DE LEVEDURAS.....	36
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REATIVAÇÃO, CRESCIMENTO E CONSERVAÇÃO DA LEVEDURA <i>Hanseniaspora uvarum</i> . ....	40
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DO INÓCULO - ESCALAS LABORATORIAL E INDUSTRIAL.....	43
FIGURA 10 - TANQUES UTILIZADOS PARA A PRODUÇÃO DO VINHO .....	44
FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE VINHO TINTO .....	47
FIGURA 12 - ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DURANTE O PROCESSO DE VINIFICAÇÃO .....	49
FIGURA 13 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE PRODUTOS DE PCR EMPREGANDO OS INICIADORES ITS1 E ITS4 PARA AS LEVEDURAS ISOLADAS DO INÓCULO ETAPAS LABORATORIAL E INDUSTRIAL.....	61
FIGURA 14 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE PRODUTOS DE PCR-RAPD EMPREGANDO O INICIADOR (GTG) <sub>5</sub> COM LINHAGENS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	62
FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE PRODUTOS DE PCR EMPREGANDO OS INICIADORES ITS1 E ITS4 PARA AS LEVEDURAS ISOLADAS DO TEMPO ZERO HORA .....	65
FIGURA 16 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS DA FERMENTAÇÃO - TEMPO ZERO HORA, UTILIZANDO A ENZIMA <i>DdeI</i> .....	66

FIGURA 17 -PERFIL ELETROFORÉTICO DE PRODUTOS DE PCR EMPREGANDO OS INICIADORES ITS1 E ITS4 PARA AS LEVEDURAS ISOLADAS DO TEMPO 24 HORAS.....	71
FIGURA 18 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE PRODUTOS DE PCR EMPREGANDO OS INICIADORES ITS1 E ITS4 PARA AS LEVEDURAS ISOLADAS DOS TEMPOS 139 E 188 HORAS DE FERMENTAÇÃO ...	72
FIGURA 19 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE PRODUTOS DE PCR-RAPD EMPREGANDO O INICIADOR (GTG) <sub>5</sub> PARA FINS DE COMPARAÇÃO DE LINHAGENS DE <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	73
FIGURA 20 - CROMATOGRAMA DE ANÁLISE DE RESVERATROL DO VINHO ELABORADO EM 2018.....	86

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - TEOR DE AÇÚCARES TOTAIS DOS VINHOS ELABORADOS EM 2017 E 2018 .....	75
GRÁFICO 2 - GRADUAÇÃO ALCOÓLICA DOS VINHOS ELABORADOS EM 2017 E 2018 .....	76
GRÁFICO 3 - CONCENTRAÇÃO DE ACIDEZ TOTAL (a), VOLÁTIL (b) E FIXA (c) DOS VINHOS ELABORADOS EM 2017 E 2018.....	77
GRÁFICO 4 - VALORES DE pH DOS VINHOS ELABORADOS EM 2017 E 2018...	78
GRÁFICO 5 - CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO SECO TOTAL E REDUZIDO DOS VINHOS ELABORADOS EM 2017 E 2018 .....	80

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - REAGENTES EMPREGADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS DO rDNA NA REAÇÃO DE PCR .....	50
TABELA 2 - REAGENTES EMPREGADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO COM INICIADORES (GTG) <sub>5</sub> .....	52
TABELA 3 - IDENTIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS ISOLADAS DA ETAPA INDUSTRIAL DO INÓCULO.....	60
TABELA 4 - TAMANHO DOS <i>AMPLICONS</i> E DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS DO TEMPO ZERO HORA .....	64
TABELA 5 - TAMANHO DOS <i>AMPLICONS</i> E DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS DO TEMPO 24 HORAS.....	69
TABELA 6 - IDENTIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS ISOLADAS APÓS 139 HORAS E 188 HORAS DE FERMENTAÇÃO UTILIZANDO TAMANHO DOS <i>AMPLICONS</i> E DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO .....	72
TABELA 7 - RESULTADOS DE ÁLCOOIS SUPERIORES DOS VINHOS ELABORADOS EM 2017 E 2018 .....	81
TABELA 8 - RESULTADOS DE ALDEÍDO ACÉTICO E ACETATO DE ETILA DOS VINHOS ELABORADOS EM 2017 E 2018 .....	83

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
3.1	VITIVINICULTURA .....	18
3.2	PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE VINHO .....	20
3.2.1	Desenvolvimento de leveduras durante a fermentação .....	24
3.2.2	Formação de etanol e outros subprodutos da fermentação .....	26
3.3	RESVERATROL E SUAS PROPRIEDADES NO VINHO .....	31
3.4	IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE LEVEDURAS .....	35
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
4.1	MICRO-ORGANISMO .....	38
4.2	MEIOS DE CULTURA .....	38
4.3	CRESCIMENTO E CONSERVAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO .....	39
4.4	INÓCULO - ESCALAS LABORATORIAL E INDUSTRIAL.....	41
4.5	MATÉRIA-PRIMA .....	44
4.6	ELABORAÇÃO DE VINHO TINTO .....	44
4.7	ACOMPANHAMENTO MICROBIOLÓGICO NO PROCESSO DE VINIFICAÇÃO.....	48
4.7.1	Identificação dos micro-organismos isolados por PCR-RFLP .....	50
4.7.2	Identificação dos micro-organismos isolados por PCR-RAPD .....	51
4.8	ANÁLISES DE PARÂMETROS ENOLÓGICOS .....	52
4.8.1	Teor de açúcares totais .....	52
4.8.2	Graduação alcoólica .....	53
4.8.3	Valor de pH.....	53
4.8.4	Acidez total .....	53
4.8.5	Acidez volátil.....	53
4.8.6	Acidez fixa .....	54
4.8.7	Sulfatos.....	54
4.8.8	Dióxido de Enxofre Total .....	54
4.8.9	Extrato seco total e extrato seco reduzido .....	54
4.9	ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	55

4.10	ANÁLISE DE RESVERATROL .....	55
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>57</b>
5.1	ELABORAÇÃO DE VINHO TINTO .....	57
5.2	ACOMPANHAMENTO MICROBIOLÓGICO NO PROCESSO DE VINIFICAÇÃO .....	59
5.2.1	Inóculo .....	59
5.2.2	Fermentação .....	63
5.3	ANÁLISES DE PARÂMETROS ENOLÓGICOS .....	74
5.4	ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS .....	80
5.5	ANÁLISE DE RESVERATROL .....	85
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>88</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>89</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A elaboração de vinho é uma importante atividade econômica brasileira, que vem crescendo gradativamente. O estado do Rio Grande do Sul concentra 90% da produção de vinhos no Brasil, e em 2016, produziu 244,9 milhões de litros de vinhos, sucos e derivados, segundo Mello (2017). De 2016 para 2017, a produção de vinhos no Brasil aumentou de 130 para 340 milhões de litros, o que representou um crescimento de 169%, elevando o país à 14<sup>a</sup> posição no ranking mundial de produção de vinhos. Desde o ano de 2000, segundo dados da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (2017) houve aumento no consumo mundial de vinhos de 225 milhões de hectolitros para 243,2 milhões de hectolitros em 2017.

Cerca de 80% da produção de vinhos no Brasil ocorre com uvas das espécies *Vitis labrusca* ou *Vitis bourquina* e no restante, são utilizadas uvas *Vitis vinifera*. A uva *Vitis labrusca* possui alta aceitação pelo consumidor, dado o sabor e aroma característicos tanto da uva *in natura* quanto dos vinhos e sucos elaborados, segundo Biasoto et al. (2014).

O plantio da uva *Vitis labrusca*, cultivar Bordô ocorre principalmente nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná e sul de Minas Gerais, em razão da sua baixa adaptação ao clima tropical. A referida cultivar é rica em antocianinas e, conseqüentemente, em matéria corante e é resistente a doenças fúngicas. (SILVEIRA et al., 2015a; RITSCHER et al., 2018).

Segundo histórico da literatura sobre enologia, leveduras não-*Saccharomyces* possuem baixo poder fermentativo. Este fato também foi demonstrado nos estudos dos autores Tristezza et al. (2012) e Albertin et al. (2016), os quais relatam que as leveduras não-*Saccharomyces* não são capazes de consumir todo o açúcar contido em mostos de uvas e por isso há necessidade de inoculação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* no mosto, para que a fermentação alcoólica se complete.

Contudo, há um crescente interesse em utilizar leveduras não-*Saccharomyces* em vinificação para aumentar a complexidade e diferenciação dos vinhos. Estas leveduras não convencionais podem contribuir para o realce do aroma e sabor do vinho, pois produzem um largo espectro de enzimas e metabólitos secundários, segundo Lleixà et al. (2016). Em particular, a levedura *Hanseniaspora*

*uvarum* tem essa característica acentuada, conforme apontam respectivamente, as pesquisas de Masneuf-Pomarede et al. (2016); Tristezza et al. (2016) e Albertin et al. (2016).

O uso de inóculo líquido empregando leveduras autóctones não é comum entre as vinícolas. A forma convencional de inoculação dá-se por hidratação imediata de leveduras secas ativas. O presente estudo pretende avaliar a eficácia do inóculo líquido de leveduras não-*Saccharomyces* na elaboração de vinho em escala industrial, sem o uso da inoculação sequencial ou co-inoculação com levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar inóculo líquido da levedura autóctone *Hanseniaspora uvarum* como insumo para elaboração de vinho tinto de mesa seco em escala industrial a partir de uvas *Vitis labrusca* cultivar Bordô.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver o inóculo líquido em escala laboratorial com a levedura *Hanseniaspora uvarum* autóctone para a elaboração de vinho em escala industrial.

Multiplicar o inóculo laboratorial em escala industrial já no ambiente da vinícola.

Investigar a prevalência da levedura *Hanseniaspora uvarum* autóctone nas etapas laboratorial e industrial do inóculo e durante a fermentação no processo de vinificação em escala industrial.

Analisar os parâmetros enológicos: teor de açúcares, graduação alcoólica, valor de pH, acidez total, acidez volátil, sulfatos, dióxido de enxofre total, extrato seco total e reduzido do produto acabado.

Quantificar os compostos voláteis: álcoois superiores (1-propanol; 2-metil,1-Propanol; 3-Metil,1-Butanol), aldeído acético e acetato de etila, no produto acabado.

Mensurar o resveratrol livre (*trans*-resveratrol) no produto acabado.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 VITIVINICULTURA

De acordo com Pereira; Guerra e Manfroi (2009), o Brasil está situado em um dos grandes polos de produção mundial de vinhos, ao lado do Chile, Argentina, África do Sul, Austrália e Nova Zelândia. A videira é originária do Cáucaso, de onde foi difundida por toda a costa mediterrânea há centenas de anos, tanto para a produção de fruta para consumo *in natura*, como para a elaboração de vinhos.

O cultivo de uvas *Vitis vinifera* é desfavorecido pelas condições climáticas de várias regiões brasileiras, pois a colheita das uvas acontece durante períodos de chuva. No Brasil predomina-se o cultivo de uvas americanas *Vitis labrusca*, devido às condições climáticas mais favoráveis a este tipo de uva. Esta espécie é conhecida por ser mais resistente a doenças, adaptando-se a verões úmidos, de acordo com Biasoto et al. (2014). Cerca de 80% dos vinhos produzidos no Brasil são a partir desta espécie de uva. As cultivares Bordô, Isabel, Niágara e Concord correspondem a 50% das uvas *Vitis labrusca* cultivadas, conforme a pesquisa de Toaldo et al. (2015).

A uva cultivar Bordô foi introduzida no Rio Grande do Sul em 1839 sob a denominação de *Ives* e se expandiu pelas demais regiões, dado à boa produtividade, tornando-se longeva. É uma cultivar que apresenta cacho pequeno com formato cilíndrico cônico alado, bagas pequenas de coloração preta, com polpa mucilagínosa. A uva cultivar Bordô apresenta maturação precoce e é bastante resistente às doenças míldio e antracnose. Em seu estágio ideal de maturação dificilmente atinge 16,9 °Brix. Apresenta teor de sólidos solúveis de até 16,02 °Brix, com acidez total de 65 mEq.L<sup>-1</sup> e pH de 3,29. (CASTILHOS, 2016). Segundo Dorneles et al. (2005) as uvas Bordô *Vitis labrusca* cultivadas no estado do Paraná utilizadas nos mostos dos processos de vinificação, usualmente apresentam valores iniciais de sólidos solúveis de 14,5 °Brix.

O cultivo de uva para a produção de vinhos (vitivinicultura), é diferente do cultivo de uvas de mesa para o consumo *in natura* (viticultura). Na vitivinicultura, as uvas devem ser colhidas quando a composição estiver adequada e equilibrada para que as transformações do mosto resultem em vinhos de qualidade, conforme

argumentam Pereira; Guerra e Manfroi (2009). O teor de açúcares depende da espécie, cultivar, grau de maturação e condições sanitárias da fruta.

O grau de maturação das uvas é um dos principais fatores que irão determinar a qualidade do vinho, especialmente no que se refere ao aumento do teor de açúcares e diminuição da acidez. Os açúcares presentes na uva são principalmente glicose e frutose, geralmente na mesma proporção, e arabinose, xilose e sacarose em concentrações menores, é o que se observou na pesquisa de Ribéreau-Gayon et al. (2006). Conforme os achados de Aranda et al. (2011), os principais polissacarídeos encontrados nas uvas são as pectinas, gomas e dextrinas.

Nas uvas são encontrados compostos nitrogenados, como amônia, aminoácidos, polipeptídeos, proteínas, nitratos, aminas e vitaminas. Os nucleotídeos são incorporados pelas leveduras nos ácidos nucleicos para sintetizar os seus próprios nucleotídeos. Os aminoácidos são importantes como subunidades na biossíntese de enzimas e outras proteínas, também podem ser empregados como fonte de nitrogênio ou de energia para o metabolismo das leveduras, de acordo com Aranda et al. (2011).

As uvas contêm alta concentração de compostos fenólicos, que podem ser encontrados na casca, polpa e sementes. Estes compostos fenólicos estão geralmente na forma de complexos glicosídicos ou polímeros, conforme Gürbüz et al. (2007). Para Toaldo et al. (2015), os principais compostos fenólicos em mosto de uvas são: antocianinas, catequinas, flavonóis, ácidos fenólicos e resveratrol. Segundo Gürbüz et al. (2007), estes compostos passam por reações de oxidação e condensação durante a fermentação e maturação do vinho, e isso pode alterar sua cor e adstringência.

Os ácidos orgânicos málico e tartárico, presentes na uva, contribuem com 90% de sua acidez fixa. A concentração de ácido tartárico permanece inalterada durante a colheita da uva (AMORIM et al., 2006). E conforme Aranda et al. (2011), os ácidos cítrico e ascórbico são encontrados em menor concentração. Durante o amadurecimento da uva, a concentração de ácido málico diminui, principalmente em climas quentes, e isto pode resultar em vinhos com pouco sabor e suscetíveis à contaminação, portanto, o teor deste ácido é um indicativo do período adequado para a colheita da uva. Em climas frios, o ácido málico permanece elevado, o que pode acarretar em vinhos de sabor ácido, conforme sugerem Ribéreau-Gayon et al. (2006).

### 3.2 PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE VINHO

A colheita da uva para vinificação é uma operação denominada vindima. Os pesquisadores Lima et al. (2001) destacam que a fixação da data do início da vindima é importante para a elaboração de cada tipo de vinho. De acordo com o artigo 3º da Lei nº 7.678 de 08 de novembro de 1988, disposta em (BRASIL, 1988), vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura. É importante ressaltar que de acordo com esta legislação, um vinho pode ter a denominação de determinada uva se contiver, no mínimo, 75% dessa cultivar. Esta exigência implica que outras cultivares de uva podem ser misturas, em proporção de até 25%, de acordo com Gallice et al. (2011).

A qualidade do vinho é influenciada pela operação de separação da ráquis e esmagamento da uva durante a sua elaboração. A ráquis, se estiver presente no mosto, pode interferir negativamente na sua composição química diluindo-o, devido ao seu baixo teor de açúcares e conferindo gosto amargo. O efeito do esmagamento da uva é contribuir para o aumento da superfície de contato entre o mosto e a parte sólida e facilitar a dissolução da matéria corante e do tanino.

De acordo com a Lei nº 7.678 de 8 de novembro de 1988, durante a elaboração de vinho é permitido fazer adições de insumos no mosto, desde que não tenha o propósito de compensar uma maturação imperfeita. (BRASIL, 1988). O dióxido de enxofre, ou anidrido sulfuroso, é adicionado ao mosto na forma de gás sulfuroso, anidrido sulfuroso líquido ou de metabissulfito de potássio, que possui as funções de proteção contra as oxidações, inibição do desenvolvimento de micro-organismos, inibição de enzimas oxidativas e proteção dos aromas dos vinhos, de acordo com os experimentos de Ribéreau-Gayon et al. (2004). Conforme orienta Amorim et al. (2006), o emprego de dióxido de enxofre deve ser muito cuidadoso, pois pode afetar negativamente a qualidade do vinho, por gerar degradação de antocianinas ou por gerar defeitos organolépticos desagradáveis causados por compostos enxofre, como sulfeto de hidrogênio.

Mostos de uvas que não tenham atingido uma boa maturação, necessitam de chaptalização<sup>1</sup> para alcançar um grau alcoólico mais elevado e garantir a melhor conservação do vinho. É permitido legalmente o aumento de até 2% v/v a 20 °C de álcool com a utilização de açúcar de cana. (BRASIL, 2014). O momento ideal para adicionar a sacarose é ao final da fase de crescimento exponencial das leveduras (o que equivale de 2 a 4 dias após o início da fermentação alcoólica), pois não interrompe a fermentação. A sacarose é clivada pela enzima invertase em glicose e frutose. O procedimento de chaptalização aumenta também proporcionalmente os teores de glicerol, ácido succínico e 2,3-butanodiol, conforme as pesquisas de Ribéreau-Gayon et al. (2006).

Outras correções de mosto são a acidificação, para vinhos produzidos com uvas cultivadas em regiões quentes, ou a desacidificação, para uvas cultivadas em regiões chuvosas, que dificultam a completa maturação e queda do ácido málico, segundo Amorim et al. (2006). O vinho pode ser corrigido quanto à acidez, seguindo as normas dispostas na legislação vigente RDC nº 123, de 04 de novembro de 2016. (BRASIL, 2016).

No processo de vinificação, a fermentação alcoólica é a principal etapa e pode iniciar espontaneamente na presença de leveduras da própria uva ou ter origem nos equipamentos, mas práticas usuais recomendam adicionar ao mosto uma levedura com características fermentativas conhecidas. Além do etanol, outros compostos são formados durante a fermentação alcoólica, tais como álcoois superiores, aldeídos, ésteres, glicerol, ácido succínico, diacetil, acetoína e 2,3-butanodiol, de acordo com Moreno-Arribas; Polo (2009).

Na elaboração de vinhos tintos, a maceração – período em que a parte sólida da uva, cascas e sementes, permanecem em contato com o mosto – ocorre simultaneamente com a fermentação alcoólica e promove a extração de constituintes da polpa, casca e sementes. Entre as substâncias extraídas estão os compostos fenólicos que contribuem para a coloração e estrutura do vinho, aromas e/ou seus precursores, compostos nitrogenados, polissacarídeos e minerais, de acordo com Ribéreau-Gayon et al. (2006) e Amorim et al. (2006).

---

<sup>1</sup> Chaptalização é a correção do teor de açúcares do mosto, o qual adiciona-se açúcar de cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum*, para que atinja o grau alcoólico estabelecido em legislação. Este método foi difundido pelo médico e químico francês Antoine Chaptal. (RIZZON; DALL'AGNOL, 2007).

Durante a fermentação alcoólica, são feitas as remontagens, para extrair os componentes da parte sólida da uva, homogeneizar a massa vínica, controlar a temperatura e evitar o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis nas partes sólidas das uvas que não estejam submersas, segundo Rizzon; Meneguzzo e Manfroi (2004).

No final da fermentação alcoólica, após a descuba, inicia-se a fermentação malolática, que é a transformação do ácido málico ( $pK_{a1} = 3,4$ ;  $pK_{a2} = 5,13$ ) em ácido láctico ( $pK_a = 3,85$ ), reduzindo a acidez total. Na fermentação malolática, as bactérias lácticas utilizam além do ácido málico, os açúcares residuais como substrato. No término da fermentação malolática, o vinho é transferido de um recipiente para outro para a maturação, e eliminação das bactérias, leveduras, resíduos sólidos e matéria orgânica que se depositam no fundo do recipiente de fermentação, pois se o vinho permanecer em contato com este material pode adquirir sabores e aromas indesejados, segundo Rizzon; Meneguzzo e Manfroi (2004).

Na maturação do vinho ocorre a precipitação de polifenóis, ácido tartárico e leveduras, e é efetuado o atesto, que confere ao vinho a proteção do contato com o oxigênio, evitando o crescimento de micro-organismos indesejados e a oxidação, segundo Guerra et al. (2009).

Mesmo que as fermentações alcoólica e malolática tenham sido concluídas, neste estágio o vinho não está totalmente límpido e não possui estabilidade necessária para ser engarrafado. O vinho novo possui em suspensão partículas sólidas dos mais diversos tamanhos, formas e pesos específicos. Entre as alternativas naturais para alcançar a clarificação e a estabilidade dos vinhos estão as trasfegas, frio do inverno e o amadurecimento em barricas de madeira de carvalho, no caso dos vinhos tintos finos. A trasfega corresponde à retirada do vinho do recipiente e separação do depósito que se acumula no fundo. Além dessas práticas enológicas, geralmente o vinho também é clarificado por colagem, refrigeração e filtração, conforme fundamentam Rizzon; Meneguzzo e Manfroi (2004).

A colagem é a aplicação de clarificantes, colas orgânicas ou minerais, para eliminar partículas suspensas nos vinhos, tais como proteínas e metais (ferro e cobre). Com isso diminuem-se as casses metálicas (excesso de metais) e a carga microbiana dos vinhos, conforme Amorim et al. (2006).



O tratamento do vinho por refrigeração em baixa temperatura,  $-3^{\circ}\text{C}$  por um período de aproximadamente 15 dias, favorece a insolubilidade do bitartarato de potássio reduzindo a acidez total e inibe o aparecimento de cristais de bitartarato dentro das garrafas, segundo Amorim et al. (2006).

A filtração tem o objetivo de eliminar partículas em suspensão, reduzir a população microbiana e auxiliar a estabilidade microbiológica dos vinhos, tornando-os mais brilhantes e límpidos. Para tanto, são utilizados filtros de terra diatomáceas, de placas de celulose e de membrana esterilizantes. A filtração deve ser realizada com cuidado para que não sejam eliminadas substâncias importantes para a qualidade sensorial dos vinhos, de acordo com Amorim et al. (2006).

Os vinhos podem ser armazenados em barricas de carvalho, com o objetivo de se obter taninos mais arredondados, enriquecidos em polifenóis, com diferentes aromas e tonalidade de cor. São os chamados vinhos de guarda, que possuem grande complexidade aromática e gustativa. Para tanto, é necessário que o período de maceração seja maior e as remontagens sejam feitas com mais frequência para que o vinho tenha concentração suficiente de taninos para permanecer nas barricas. A madeira não deve mascarar os aromas dos vinhos, por isso é importante determinar o tempo adequado de permanência nas barricas. A cave onde são armazenadas as barricas deve ter umidade relativa entre 70 e 90%, e temperatura próxima a  $15^{\circ}\text{C}$ , conforme Rizzon; Dall'Agnol (2007) e Clímaco; D'Abreu (2008).

O envelhecimento do vinho pode ser feito dentro da garrafa em caves subterrâneas ou depósitos apropriados com temperatura de aproximadamente  $16^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa moderada. A cor do vinho evolui do vermelho-violeta quando jovem, ao vermelho-amarronzado. Os taninos polimerizam-se diminuindo a adstringência e contribuem com o equilíbrio do vinho. Seus aromas iniciais evoluem formando os aromas terciários que compõem o buquê do vinho (conjunto dos aromas primários, secundários e terciários, na análise de Clímaco; D'Abreu (2008).

Antes do engarrafamento é importante avaliar se o vinho está em conformidade com a legislação vigente, Instrução Normativa nº 14 de 02 de fevereiro de 2018, Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho e Derivados da Uva e do Vinho, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (BRASIL, 2018). Normalmente utiliza-se engarrafadoras de nível constante devidamente esterilizadas, que injetam nitrogênio ou gás carbônico antes

do enchimento com vinho e novamente antes da colocação da rolha, para diminuir os efeitos oxidativos do ar, de acordo com Silveira et al. (2015b).

Conforme o Decreto nº 8.198 de 20 de fevereiro de 2014 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2014), os rótulos dos vinhos devem conter obrigatoriamente marca, teor alcoólico, volume, aditivos utilizados, local de origem, dados do produtor, classificação quanto a cor e teor de açúcares, responsável técnico, número e registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, prazo de validade, composição do produto e informações que atendam ao Código de Defesa do Consumidor.

### 3.2.1 Desenvolvimento de leveduras durante a fermentação

A fermentação do mosto de uva para a elaboração de vinhos de qualidade é um processo ecológico e bioquímico complexo; envolve o desenvolvimento sequencial de diferentes micro-organismos, dependendo do modo como estes são afetados pelo meio ambiente. Este processo inclui a interação de fungos filamentosos, leveduras, bactérias lácticas, bactérias acéticas, como também de micovírus e bacteriófagos, que afetam diretamente os micro-organismos provenientes das uvas, segundo estudos de Aranda et al. (2011). Pretorius (2000) argumenta que dentre estes micro-organismos, as leveduras possuem papel central na interação com o mosto de uvas.

A variação do vinho entre safras e entre regiões é de certa forma aceita e esperada. A combinação única de clima, topografia, solo, manejo agrônomo e protocolo de vinificação é conhecida como *terroir*. Este *terroir* modela o caráter das vinhas que ali crescem e das uvas que elas produzem. Mesmo que os processos de elaboração sejam rigorosamente idênticos, é impossível elaborar um vinho igual ao outro, seja a partir de uvas de diferentes origens ou de safras distintas, de acordo com Gilbert et al. (2014).

As bagas das uvas apresentam na sua superfície uma população de diferentes leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*. Suas atividades metabólicas individuais influenciam a qualidade sensorial e as características organolépticas dos vinhos. Entre os gêneros de leveduras não-*Saccharomyces* presentes nas uvas se encontram *Brettanomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*,

*Metschnikowia*, *Rhodotorula*, conforme Belda et al. (2017), e em maior porcentagem, o gênero *Hanseniaspora*, de acordo com Aranda et al. (2011).

Segundo Aranda et al. (2011), as espécies de leveduras não-*Saccharomyces* provenientes da microflora da uva iniciam a fermentação alcoólica espontânea do mosto de uva, e a partir da metade do processo de vinificação, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* são os micro-organismos dominantes. Fleet (2008) observou que espécies autóctones pertencentes aos gêneros *Hanseniaspora* sp., *Candida* sp. e *Kluyveromyces* sp. também crescem em mosto de uvas que foram inoculados com culturas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Apesar do curto espaço de tempo no qual as leveduras não-*Saccharomyces* permanecem no mosto, a atividade destas leveduras durante as fermentações é suficiente para causar impacto com relação à composição química do vinho. Muitas das espécies de leveduras não-*Saccharomyces*, especialmente aquelas que apresentam metabolismo fracamente fermentativo, têm sido associadas à produção de outros metabólitos que favorecem o aroma final dos vinhos, segundo Comitini et al. (2011).

De acordo com Fleet (2008) e Comitini et al. (2011), algumas leveduras podem apresentar uma velocidade de crescimento muito lenta e não se estabelecerem ao final do processo fermentativo, mas mesmo assim possuem outras propriedades enológicas que justificam seu estudo. Espécies de *Hanseniaspora* sp. podem produzir glicosidases e proteases em maior quantidade que espécies de *Saccharomyces* sp. promovendo maior diversidade de compostos aromáticos voláteis ao vinho; *Candida stellata* ou *Candida zemplinina* podem contribuir com teores aumentados de glicerol; *Kluyveromyces thermotolerans* pode diminuir o teor de ácido láctico, e espécies de *Schizosaccharomyces* sp. podem diminuir a acidez do vinho pelo metabolismo do ácido málico.

Hong; Park (2013) fizeram experimentos com levedura *Hanseniaspora uvarum* isolada de uvas *Vitis labrusca* da cultivar Campbell Early, Coréia, utilizando 10 kg de mosto de uvas desta cultivar. As células, previamente crescidas, desta levedura foram inoculadas na presença de 200 mg.mL<sup>-1</sup> de metabissulfito de potássio até uma concentração final de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> de leveduras, contendo 10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> de leveduras *Hanseniaspora uvarum*. Estes pesquisadores obtiveram padrão de fermentação semelhante ao mosto inoculado com *Saccharomyces cerevisiae* comercial (W3). Contudo, o mosto inoculado com *Hanseniaspora uvarum*

apresentou níveis mais elevados de ácido orgânico (especialmente ácido láctico), aldeídos e álcoois secundários (exceto o álcool n-propílico), bem como um maior escore, de  $3,58 \pm 0,28$  na avaliação sensorial em relação à cor, aroma e sabor comparado ao mosto inoculado com *Saccharomyces cerevisiae*, que apresentou escore de  $3,00 \pm 0,24$ .

Lleixà et al. (2016) demonstraram que o interesse no uso de leveduras não-*Saccharomyces* na produção de vinho tem aumentado devido às suas contribuições positivas para a qualidade do vinho. Os autores salientam que *Hanseniaspora vineae* apresentou uma boa taxa de fermentação em mosto de uvas *Vitis vinifera* cultivar Macabeo. No entanto, enfatizam que há necessidade de inoculação com *Saccharomyces cerevisiae*, porque a levedura *Hanseniaspora vineae* é incapaz de terminar a fermentação alcoólica.

Segundo relatos de Vigentini et al. (2016), novos estilos de produtos vitivinícolas intensificaram o interesse em buscar novas leveduras escondidas na diversidade microbiana. O caráter varietal de um vinho pode depender das atividades metabólicas de micro-organismos que participam na transformação do mosto e no envelhecimento do vinho. Além disso, tem sido observado que pesquisadores estão buscando isolar e identificar leveduras “autóctones” como estratégia para promoção e proteção de vinhos locais, uma vez que o uso destas leveduras em vinhos possibilita a ligação entre território, proteção ambiental e produto final, com grande impacto comercial.

A inoculação controlada de diferentes espécies de leveduras em fermentações vínicas permite explorar as características enológicas de leveduras não-*Saccharomyces* e de se estudar como estas diferentes espécies interagem com leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, de acordo com Comitini et al. (2011).

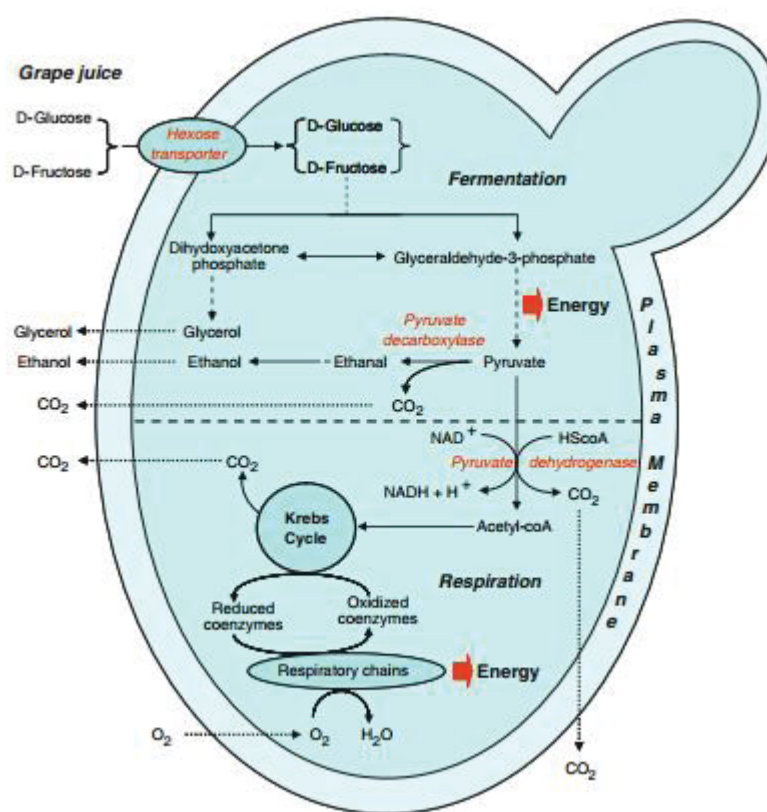
### 3.2.2 Formação de etanol e outros subprodutos da fermentação

A fermentação alcoólica, efetuada por leveduras, é a transformação anaeróbica de açúcares, principalmente glicose e frutose em etanol e gás carbônico. O processo bioquímico apresenta a estequiometria simplificada de acordo com a equação  $C_6H_{12}O_2 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + CO_2$ . No entanto, a fermentação alcoólica é um processo mais complexo. Ao mesmo tempo em que essa reação geral ocorre, outros processos bioquímicos, químicos e físico-químicos acontecem concomitantemente,

tornando possível transformar o mosto de uva em vinho. Simultaneamente, outros componentes da uva também são transformados pelo metabolismo das leveduras. Sem a produção destas outras substâncias, o vinho teria pouco interesse organoléptico. (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

As leveduras são micro-organismos anaeróbios facultativos, pois utilizam açúcares nas duas vias metabólicas diferentes: respiração e fermentação. (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). A figura 1 ilustra essas vias bioquímicas.

FIGURA 1 - RESPIRAÇÃO CELULAR E FERMENTAÇÃO EM CÉLULAS DE LEVEDURAS



FONTE: MORENO-ARRIBAS; POLO (2009)

Ambas as vias começam com glicólise, que gera piruvato como produto final. O piruvato pode ser transformado em etanol e dióxido de carbono pela enzima piruvato descarboxilase e o etanol pode ser reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase. Este metabolismo, denominado fermentação alcoólica, ocorre dentro do citoplasma. Ambos os produtos finais de fermentação alcoólica, etanol e dióxido de carbono, são transportados para fora da célula por difusão simples. A fermentação alcoólica regenera o NAD<sup>+</sup> consumido durante a glicólise e dá à

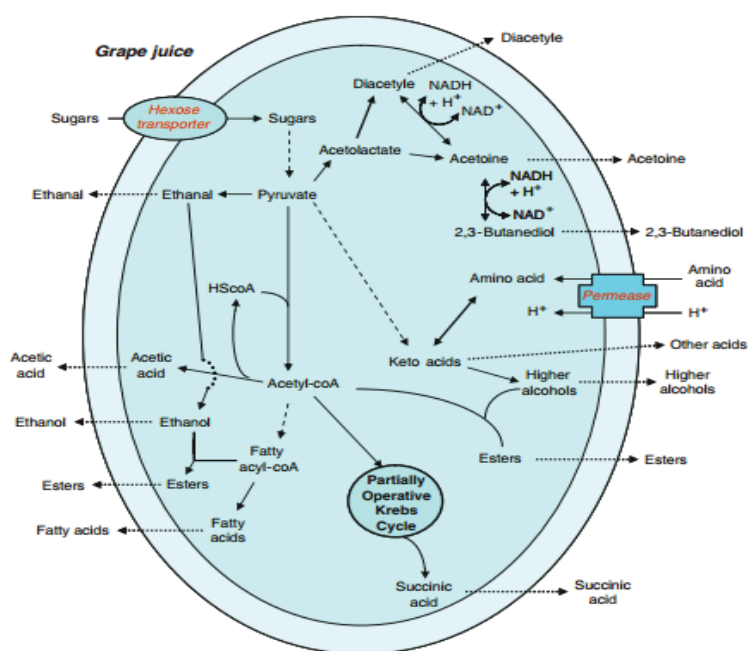
levedura um ganho de energia de apenas duas moléculas de ATP por hexose metabolizada. (BARNETT; ENTIAN, 2005).

O piruvato também pode ser transformado em acetil-coA e dióxido de carbono pela piruvato desidrogenase. Esta reação reduz  $\text{NAD}^+$  para NADH e deve incorporar a coenzima A. O acetil-coA pode então ser incorporado ao ciclo de Krebs, sendo transformado em dióxido de carbono e produzindo várias moléculas de coenzimas reduzidas (NADH e  $\text{FADH}_2$ ). As coenzimas reduzidas produzidas pelo Ciclo de Krebs, e pela glicólise, são posteriormente reoxidadas nas cadeias respiratórias, reduzindo o oxigênio molecular à água. (BARNETT; ENTIAN, 2005).

A via metabólica respiração produz de 36 a 38 moléculas de ATP por hexose metabolizada, conseqüentemente, é mais benéfico para a levedura do que a via fermentativa, em termos de energia. No entanto, na respiração, é necessário oxigênio como substrato e esta via é inibida pela alta concentração de açúcar. (CRABTREE, 1929).

Os ácidos sintetizados durante a fermentação alcoólica são principalmente ácido acético e ácido succínico (figura 2). O ácido acético é um ácido volátil, formado pela hidrólise da acetil coenzima A. O ácido succínico é um ácido fixo, sintetizado via ciclo de Krebs. (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA FORMAÇÃO DE SUBPRODUTOS NA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA



FONTE: MORENO-ARRIBAS; POLO (2009)



O principal aldeído formado durante a fermentação alcoólica é o etanal. Também chamado de aldeído acético ou acetaldeído, é um intermediário da fermentação alcoólica obtido pela descarboxilação do piruvato e posteriormente redução do etanol (figura 2). O etanal possui aroma característico que contribui para a percepção de que o vinho está oxidado, porém a fermentação alcoólica produz apenas pequenas quantidades deste composto. No entanto, o etanal também pode ser produzido a partir do etanol por oxidação química ou biológica. (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

Conforme o estudo de Styger et al. (2011), o acetaldeído é o precursor do etanol, acetato e acetoína. O diacetil é também formado a partir de acetaldeído por bactérias lácticas durante a fermentação malolática, porém leveduras também são capazes de sintetizá-lo durante a fermentação alcoólica. O diacetil é metabolizado em acetoína e 2,3 butanediol (figura 2). Em baixas concentrações ( $8 \text{ mg.L}^{-1}$ ), o diacetil confere aos vinhos aromas de nozes e fermento, porém em altas concentrações pode atribuir aromas amanteigados com características lácticas.

O acetaldeído contribui para o aroma frutado dos vinhos, contudo em concentrações acima de  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  podem atribuir odor desagradável. (TRISTEZZA et al., 2016; MOREIRA et al., 2011).

Os álcoois superiores são formados em razão de um desvio do metabolismo de aminoácidos, denominado reação de Erlich, quando os cetoácidos, que correspondem ao esqueleto de carbono dos diferentes aminoácidos são descarboxilados e reduzidos, conforme Styger et al. (2011). Estes compostos são os precursores de alguns ésteres, que tem grande impacto sensorial nos vinhos. A formação de álcoois superiores na célula da levedura durante a fermentação está representada na figura 2.

De acordo com Belda et al. (2017), mesmo em baixas concentrações, estes álcoois têm grande efeito no perfil aromático de bebidas provenientes de fermentados alcoólicos. O equilíbrio de aroma destes compostos em alimentos fermentados e bebidas é muitas vezes usado como uma “impressão digital” organoléptica para a tipicidade de vinhos de diferentes origens. Os principais álcoois superiores alifáticos incluem propanol, álcool isoamílico, isobutanol e álcool amílico. Os principais álcoois aromáticos são 2-feniletil álcool e tirosol. O autor define como ideal, concentrações de  $140 \text{ a } 420 \text{ mg.L}^{-1}$  de álcoois superiores, ao passo que

concentrações acima deste limite podem gerar um efeito prejudicial para o vinho. Contudo, as concentrações de álcoois superiores abaixo de 300 mg.L<sup>-1</sup> acrescentam um nível desejável de complexidade ao vinho.

Pesquisas mostram que há muita variação de tipo e concentração de álcoois superiores em vinhos nos quais se utiliza leveduras não convencionais, quando comparados aos vinhos produzidos com *Saccharomyces cerevisiae* mesmo em condições similares de produção. Isso indica que a regulação da via de Erlich é diferente em leveduras não convencionais quando comparadas a *Saccharomyces cerevisiae*. (BELDA et al., 2017). Os autores descrevem que as leveduras não-*Saccharomyces* *Lachancea thermotolerans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida zemplinina*, *Saccharomycodes ludwigii* e *Pichia anomala* foram denominadas como fortes produtoras de álcoois superiores, quando utilizadas como inóculo simples ou como inóculo misto com *Saccharomyces cerevisiae*, em processos de vinificação.

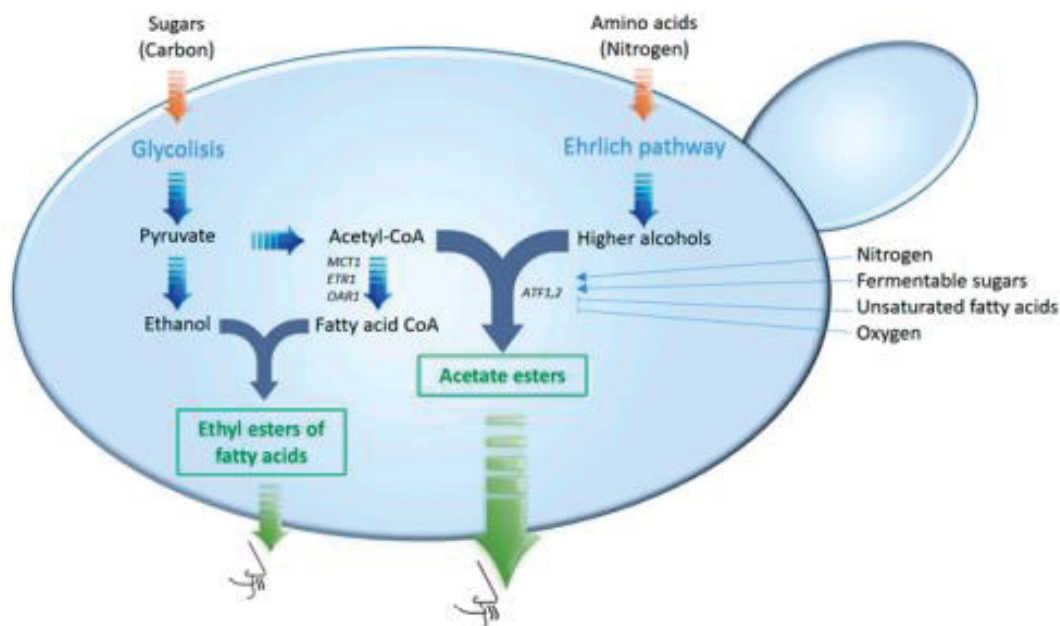
Na pesquisa de Moreira et al. (2011), foram conduzidas uma fermentação espontânea e uma fermentação utilizando inóculo de *Hanseniaspora guilliermondii* (NCYC 2380), 1% (v/v) em 100 L de mosto de uvas tintas Roriz (*Vitis vinifera*). A produção de compostos voláteis foi comparada nas duas vinificações. Eles concluíram que a levedura apiculada *Hanseniaspora guilliermondii* teve boa capacidade de produção de compostos voláteis, principalmente álcoois superiores, e pode ser utilizada como cultura iniciadora na vinificação juntamente com *Saccharomyces cerevisiae*.

Os ésteres são metabólitos secundários das leveduras e constituem o amplo grupo de compostos voláteis produzidos durante a fermentação. Contribuem positivamente, conferindo aromas frutados e florais aos vinhos, conforme descrito por Wu et al. (2017).

Segundo Moreno-Arribas; Polo (2009), ésteres são sintetizados pelo acil-CoA e álcoois com a ação das enzimas álcool-acilCoA transferases. São classificados em dois grupos: acetatos de álcoois superiores e ésteres de ácidos graxos e etanol (figura 3). O primeiro grupo é sintetizado por acetil-coA e os diferentes álcoois superiores. Estes ésteres são responsáveis por aromas de cola (acetato de etila), banana (isoamil acetato) ou rosa (fenil etanol acetato). O segundo grupo é sintetizado pelos diferentes acil-CoA e etanol, e são responsáveis por aromas frutados.



FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA SIMPLIFICADA DA FORMAÇÃO DE ÉSTERES EM LEVEDURAS

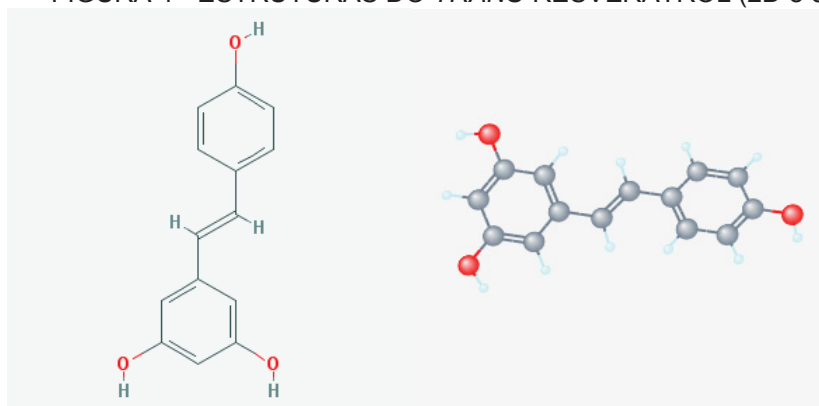


FONTE: BELDA et al. (2017)

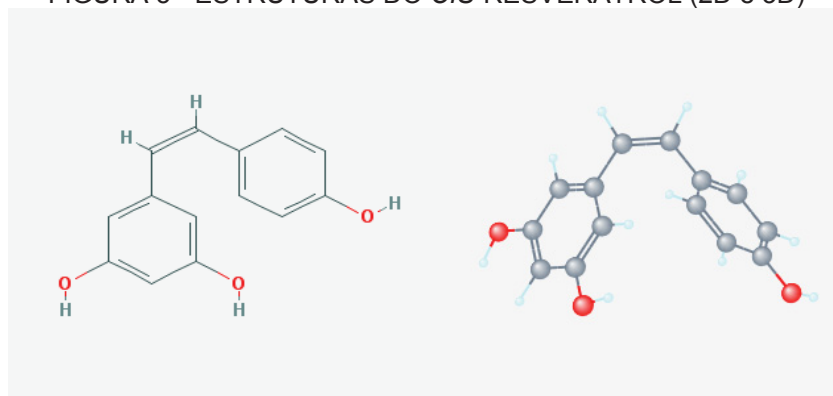
De acordo com Belda et al. (2017), ésteres são sintetizados durante a fermentação alcoólica, malolática ou durante o envelhecimento dos vinhos. Podem ser oriundos das uvas, leveduras ou bactérias, sendo que os mais importantes para o aroma dos vinhos são os originados pelas leveduras. Segundo os autores, a concentração máxima de ésteres em vinhos é atingida durante a fase estacionária de crescimento das leveduras.

### 3.3 RESVERATROL E SUAS PROPRIEDADES NO VINHO

Os estilbenos representam uma classe de produtos biologicamente ativos provenientes principalmente de plantas. O núcleo dos estilbenos é baseado em um esqueleto contendo 14 átomos de carbono composto por dois anéis fenil ligados por uma ponte de etileno. O resveratrol, 3,5,4' triidroxiestilbeno, é um exemplo de polifenol estilbeno. Ele existe nas formas *trans* (figura 4) e *cis* (figura 5), porém a forma *trans* parece ser biologicamente mais ativa. A forma *cis* pode ocorrer quando a *trans* é exposta à radiação solar ou UV. (WANG; CHATTERJEE, 2017).

FIGURA 4 - ESTRUTURAS DO *TRANS*-RESVERATROL (2D e 3D)

FONTE: PUBCHEM (2019).

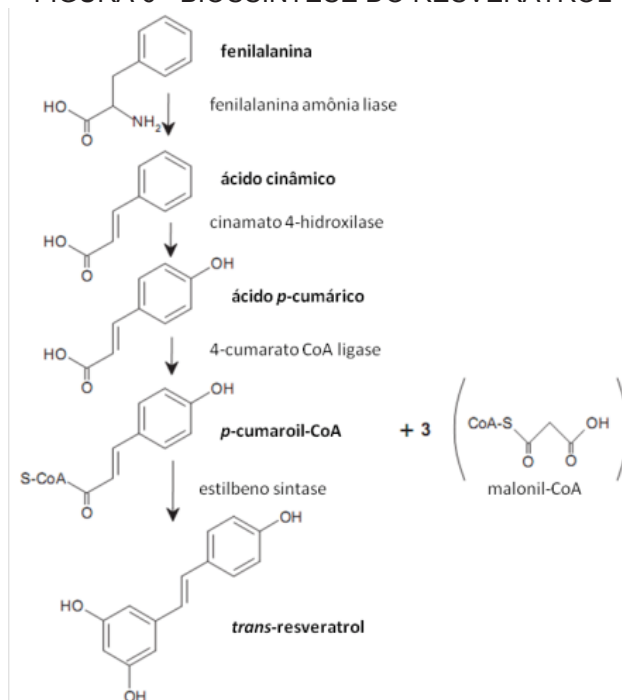
FIGURA 5 - ESTRUTURAS DO *CIS*-RESVERATROL (2D e 3D)

FONTE: PUBCHEM (2019).

O resveratrol foi primeiramente isolado em 1939, das raízes de *Veratrum grandiflorum*. A maior concentração de resveratrol foi encontrada em uma planta japonesa conhecida como knotweed japonês (*Polygonum cruspdatum*), 1 g para cada 100 g de extrato (WEISKIRCHEN; WEISKIRCHEN, 2016 e LI et al., 2016). Os autores Nguyen et al. (2017) também relatam a presença de resveratrol na referida planta.

A biossíntese do resveratrol evidenciada na figura 6, ocorre via fenilalanina, onde as enzimas fenilalanina amônia liase, cinamato-4-hidroxilase, 4-cumarato-CoA ligase e estilbeno-sintase participam. A estilbeno-sintase catalisa a formação do resveratrol pela condensação de uma molécula de *p*-cumaroil CoA com três moléculas de malonil CoA, estando estes metabólitos intermediários presentes em plantas (HASAN; BAE, 2017).

FIGURA 6 - BIOSSÍNTESE DO RESVERATROL



FONTE: Adaptado de HASAN; BAE (2017)

Hasan; Bae (2017) reportaram alguns efeitos de diferentes estímulos externos que aumentam a concentração de resveratrol em uvas, tais como: infecção por fungos patogênicos, por exemplo, *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola*, *Rhizopus stolonifer* e *Uncinula necator*; exposição à luz solar e ultravioleta; ultrasonicação; adição de sinalizadores químicos como metil jasmonato, ciclodextrinas, N-acetilglucosaminas, entre outros; exposição a ozônio; sais metálicos como cloreto de cálcio e cloreto de alumínio e finalmente exposição a alguns pesticidas e fertilizantes.

O *trans*-resveratrol, e seu isômero *cis* e seus glicosídeos (*trans* e *cis-piceid*), são encontrados em folhas de videiras e nas cascas das uvas. A concentração de *trans* e *cis*-resveratrol livres no mosto e nos vinhos pode ser influenciada por algumas práticas, entre elas, o uso de  $\beta$ -glicosidase. Foi descrito que as formas glicosídicas do resveratrol (*trans* e *cis-piceid*) podem ser hidrolisadas pela enzima  $\beta$ -glicosidase presente naturalmente nas uvas ou adicionada durante o processo fermentativo. Além disso, a hidrólise lenta do *piceid* ocorre durante o processo de envelhecimento do vinho em barris de carvalho, alterando a proporção entre resveratrol ligado e resveratrol livre. (GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU et al., 2006).

Inúmeros achados indicam que o consumo moderado de vinho é benéfico para a saúde, devido aos seus efeitos cardioprotetores. O principal componente ao qual atribui-se estas propriedades é o resveratrol, conforme aponta o estudo de Weiskirchen; Weiskirchen (2016).

Estudos *in vitro* evidenciaram as atividades do resveratrol, como por exemplo: antiviral (LIN et al., 2017); antitumoral (GAO et al., 2017); (KARIMI DERMANI et al., 2017; FUKUDA et al., 2016); anti-inflamatória (TSAI, M. H. et al., 2017 ; TOALDO et al., 2016); analgésica (TSAI, C. C. et al., 2017); neuroprotetora de oligodendrócitos (ROSA et al., 2018), entre outras. Nguyen et al. (2017) afirmaram que a concentração ativa do resveratrol variou de 1 a 25  $\mu\text{M}$ .

Dentre as diversas propriedades benéficas para a saúde, as quais foram comprovadas em recentes estudos experimentais *in vivo*, citam-se: proteção do cardiomiócito quando administrado 2,5  $\text{mg.kg}^{-1}$  de peso ao dia (LING et al. 2017); proteção do trato respiratório contra agentes poluentes, quando administrado a uma dose de 50  $\text{mg.kg}^{-1}$  por dia (YAN et al., 2017); antidiabéticas quando administrado a 30  $\text{mg.kg}^{-1}$  ao dia (ZHANG et al., 2017) e 20  $\text{mg.kg}^{-1}$  (SRIKANTA et al., 2016 e TIAN et al., 2016); neuroprotetoras quando administrado a 10  $\text{mg.kg}^{-1}$  por dia (CHEN et al., 2017); protetoras contra esteatose hepática quando administrado a 30  $\text{mg.kg}^{-1}$  e 100  $\text{mg.kg}^{-1}$  (TANG et al., 2016).

Por outro lado, Euterpio et al. (2013) citam que o *trans*-resveratrol quando administrado em uma dose igual ou acima de 1  $\text{g.kg}^{-1}$  de peso corporal possui efeitos tóxicos, portanto doses mais elevadas para melhorar a eficácia podem não ser possíveis. Além disso, seu custo é alto, pois para um humano pesando 75 kg, uma dose diária de 100  $\text{mg.kg}^{-1}$  de peso corporal custaria US \$ 6800 por ano.

Os pesquisadores Tríska et al. (2017) desenvolveram um estudo que comparou a quantidade de estilbenos em sete cultivares de uvas *Vitis vinifera* da provenientes da República Tcheca, e verificaram uma concentração de *trans*-resveratrol de 4,99  $\text{g.kg}^{-1}$  de uva, de *trans*- $\epsilon$ -viniferina de 3,24  $\text{g.kg}^{-1}$  e r2-viniferina de 1,73  $\text{g.kg}^{-1}$ . Já Pawlus et al. (2013) determinaram a concentração de resveratrol de aproximadamente 10,3  $\text{mg.kg}^{-1}$  de massa seca de uva *Vitis labrusca*, cultivar Concord. Vergara et al. (2012) encontraram concentrações de resveratrol de 1 a 6,5  $\text{g.kg}^{-1}$  de massa seca de uvas *Vitis vinifera* da região do Chile. Soural et al. (2015) quantificaram a concentração de resveratrol de 6,03  $\text{mg.g}^{-1}$  de massa seca de uva *Vitis vinifera*. Mukherjee et al. (2010) reportaram concentração de resveratrol de 0,16

a  $3,54 \mu\text{g.g}^{-1}$  em uvas (cultivar não mencionada pelos autores). Por fim, Antonioli et al. (2015) observaram concentração de resveratrol de  $36 \mu\text{g.g}^{-1}$  em uva *Vitis Vinifera*, cultivar Malbec.

São muitos os fatores que afetam a biossíntese do resveratrol nas uvas e sua transferência para o vinho, portanto, é difícil prever a quantidade de resveratrol em vinhos. Um estudo comparativo de Ragusa et al. (2017) em vinhos branco, rosé e tinto de uvas *Vitis vinifera*, mostrou concentrações de *trans*-resveratrol que variam entre  $0,1$  a  $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  de uva para vinho branco, de  $0,6$  a  $0,8 \text{ mg.kg}^{-1}$  de uva para vinho rosé, e  $2,8 \text{ mg.kg}^{-1}$  de uva para o vinho tinto. Vitrac et al. (2005) encontraram concentração de resveratrol de  $2,06$  a  $5,34 \text{ mg.L}^{-1}$  em vinhos brasileiros provenientes de uvas *Vitis vinifera*. Malovaná et al. (2001) observaram  $0,48$  a  $2,2 \text{ mg.L}^{-1}$ . Nour et al. (2012) encontraram de  $0,2$  a  $4,7 \text{ mg.L}^{-1}$  também em vinhos de uva *Vitis vinifera*. Os autores De Castilhos et al. (2017) encontraram  $2,31 \text{ mg.L}^{-1}$  em vinhos de uva *Vitis labrusca*, cultivar Isabel.

### 3.4 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE LEVEDURAS

As leveduras são fungos unicelulares cuja reprodução assexual (vegetativa) ocorre principalmente por brotamento. São classificadas em ascomicetos e basidiomicetos. Os ascomicetos produzem esporos (ascósporos) dentro de sacos fechados, chamados de ascos. Os basidiomicetos produzem esporos (basidiósporos) em estruturas chamadas de basídios. Estes esporos são células haploides que podem ser de dois tipos: “a” e “α” (*mating types*). (MADIGAN et al., 2012).

A maioria das leveduras *Saccharomyces sp.* exibem brotamento multilateral, um tipo de divisão celular na qual as células-filhas (brotos) podem aparecer em qualquer ponto da superfície celular. No brotamento bipolar, os brotos são formados apenas nos polos da célula, resultando em células com formato característico de limão, como em espécies de *Hanseniaspora sp.* Além destas características morfológicas, as leveduras podem apresentar formatos redondos, ovóides ou cilíndricos. Algumas leveduras podem desenvolver micélio verdadeiro ou pseudo-micélio, segundo Deák (2008).

De acordo com Baffi et al. (2011), tradicionalmente, a identificação de leveduras tem sido baseada em características morfológicas e fisiológicas. No

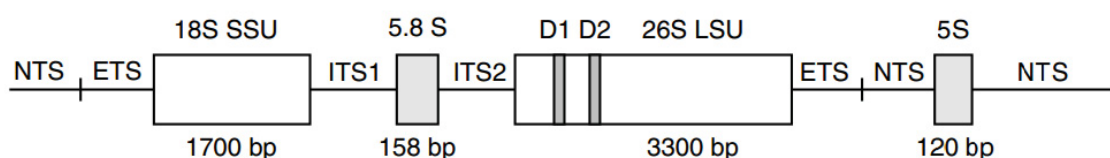
entanto, estas metodologias requerem experiência do microbiologista, pois são trabalhosas e demoradas. Em contraste, as técnicas moleculares são rápidas e confiáveis quando comparadas aos testes clássicos.

Os genes de DNA ribossomal (rDNA) que codificam para o RNA ribossomal (rRNA) são frequentemente usados para estudos filogenéticos. Os ribossomos estão presentes em todos os organismos e o rDNA está presente em várias cópias tanto em subunidades pequenas (*small subunits* - SSU) como grandes (*large subunits* - LSU). O rDNA é constituído de vários domínios, alguns dos quais são mais conservados enquanto outros são mais variáveis e podem ser utilizados, para estudos evolutivos e para determinar relações filogenéticas entre as espécies, respectivamente. (DEÁK, 2008).

Em leveduras, o rDNA é constituído pela subunidade maior (LSU ou 26S rRNA), a subunidade menor (SSU ou 18S rRNA), genes 5S e 5.8S. Além disso, contém espaçadores transcritos internos (*internal spacers* - ITS) e espaçadores transcritos externos (*external spacers* - ETS). Entre cada unidade existe também um espaçador intergênico não-transcrito (*non-transcribed spacer* NTS), sendo que o rDNA 5S normalmente está presente nesta região, mas é transcrito separadamente do restante do gene (figura 7). (DEÁK, 2008).

Ao mesmo tempo em que métodos rápidos e automatizados de sequenciamento por reação em cadeia da polimerase (PCR) foram se tornando disponíveis, sequências parciais ou completas do rDNA 18S (~ 1700 nucleotídeos), dos domínios variáveis D1/D2 (~ 600 nucleotídeos) do rDNA 26S e das regiões ITS1-5.8S-ITS2 (~ 600 nucleotídeos) de inúmeras espécies de leveduras foram determinados para a construção de bancos de dados (DEÁK, 2008).

FIGURA 7 - ESTRUTURA DE REPETIÇÃO DO rDNA DE LEVEDURAS



FONTE: DEÁK (2008).

NOTA: Estão identificadas as regiões codificadoras para as unidades 18S, 5.8S, domínios variáveis D1/D2 do 26S e 5S do rRNA, os espaçadores intergênicos não-transcritos (NTS), os espaçadores transcritos internos (ITS) e os espaçadores transcritos externos (ETS).

As sequências dos ITS incluem o gene 5.8S rRNA (a região codificadora conservada) e duas regiões flanqueantes, ITS1 e ITS2 (não-codificadoras e variáveis) que demonstram baixo polimorfismo intraespecífico e alta variabilidade interespecífica, e assim, úteis na identificação de diferentes fungos e leveduras. (AGUSTINI et al., 2014).

Para a identificação de leveduras pela técnica de PCR-RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*), primeiramente faz-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), que consiste na replicação enzimática de uma sequência-alvo *in vitro* por meio do emprego de iniciadores específicos. A segunda etapa da reação de PCR-RFLP, por sua vez, consiste na clivagem dos produtos de PCR por enzimas de restrição que cortam conjuntos palíndromos específicos. Em seguida, os fragmentos resultantes são separados por eletroforese em gel e o perfil de fragmentação é comparado ao perfil de espécies conhecidas para a identificação taxonômica do micro-organismo. (GUILLAMÖN et al., 1998).

De acordo com Teixeira et al. (2018), a técnica de identificação molecular PCR-RAPD (Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico, do inglês, *Random Amplification of Polymorphic DNA*) emprega iniciadores curtos, em torno de 10 nucleotídeos de comprimento. As temperaturas de pareamento são baixas, geralmente de 35 a 39°C. O iniciador é ligado a regiões do DNA não específicas, distribuídas aleatoriamente ao longo do genoma, permitindo assim, amplificações polimórficas. Nesta técnica, as combinações de diferentes números de *amplicons* com tamanhos distintos, geram padrões de bandas que facilitam a identificação.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MICRO-ORGANISMO

Após a solicitação e obtenção das autorizações de acesso ao patrimônio genético e de remessa (Processo nº 010198/2013-0), a levedura *Hanseniaspora uvarum*, produtora de  $\beta$ -glicosidase, foi isolada de uvas *Vitis labrusca*, cultivar Bordô provenientes do estado do Paraná, selecionada e identificada por Gaensly et al. (2015) e depositada em uma instituição credenciada mantenedora das coleções que contêm amostras de patrimônio genético de acordo com a Medida Provisória nº 2.186 -16 de 23 de agosto de 2001. (BRASIL, 2001). Contudo, com o novo marco legal da biodiversidade, consubstanciado pelo Decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016, que regulamenta a Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015 (BRASIL, 2016), foi criado um sistema eletrônico, implementado e disponibilizado em novembro de 2017, como instrumento de cadastro de atividades relacionados ao patrimônio genético: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen). Então, foi efetuado o cadastro de acesso ao patrimônio genético no SisGen desta levedura e obtida a certidão de cadastro nº A40D67A.

### 4.2 MEIOS DE CULTURA

O meio de cultura *yeast extract peptone dextrose* (YPD) utilizado nos cultivos é constituído por 20 g.L<sup>-1</sup> de dextrose (Biotec), 10 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura (BBL) e 20 g.L<sup>-1</sup> de peptona (Micromed), pH de 5,5  $\pm$  0,005, ajustado com solução aquosa de ácido sulfúrico (Synth) 1 mol.L<sup>-1</sup>. Quando empregado na forma sólida, o meio YPD foi acrescido de 20 g.L<sup>-1</sup> de ágar (Micromed).

Os componentes do meio de cultura foram pesados na balança analítica eletrônica Bioprecisa® FA 2104N, na balança semianalítica Shimadzu® BL 3200H ou na balança eletrônica Marte® AS2000. O pH do meio de cultura foi verificado e ajustado, quando necessário, utilizando o potenciômetro Tecnopon® mPA 210.

O meio de cultura foi distribuído em frascos de Erlenmeyer e esterilizado em autoclave vertical Phoenix® AV50 30 L empregando-se calor úmido na temperatura



de 121 °C e pressão de 1 atm. O tempo de esterilização foi definido a partir do volume do frasco e do volume de meio de cultura contido no frasco.

Também foi utilizado como meio de cultura suco de uva *Vitis labrusca*, cultivar Bordô *in natura* fornecido pela vinícola na etapa laboratorial do preparo do inóculo.

#### 4.3 CRESCIMENTO E CONSERVAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

As células da levedura *Hanseniaspora uvarum* conservadas por congelamento na temperatura de -20 °C, no laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações da Universidade Federal do Paraná, contidas em um microtubo, foram separadas por centrifugação a 7378 x *g* durante 6 minutos na centrífuga Sigma® 1 -14 para a remoção do agente crioprotetor. O microtubo foi aberto em cabine de segurança biológica Classe II Tipo B2 (Labconco), o sobrenadante descartado e substituído por meio líquido YPD pH 5,5 ± 0,005 e homogeneizado.

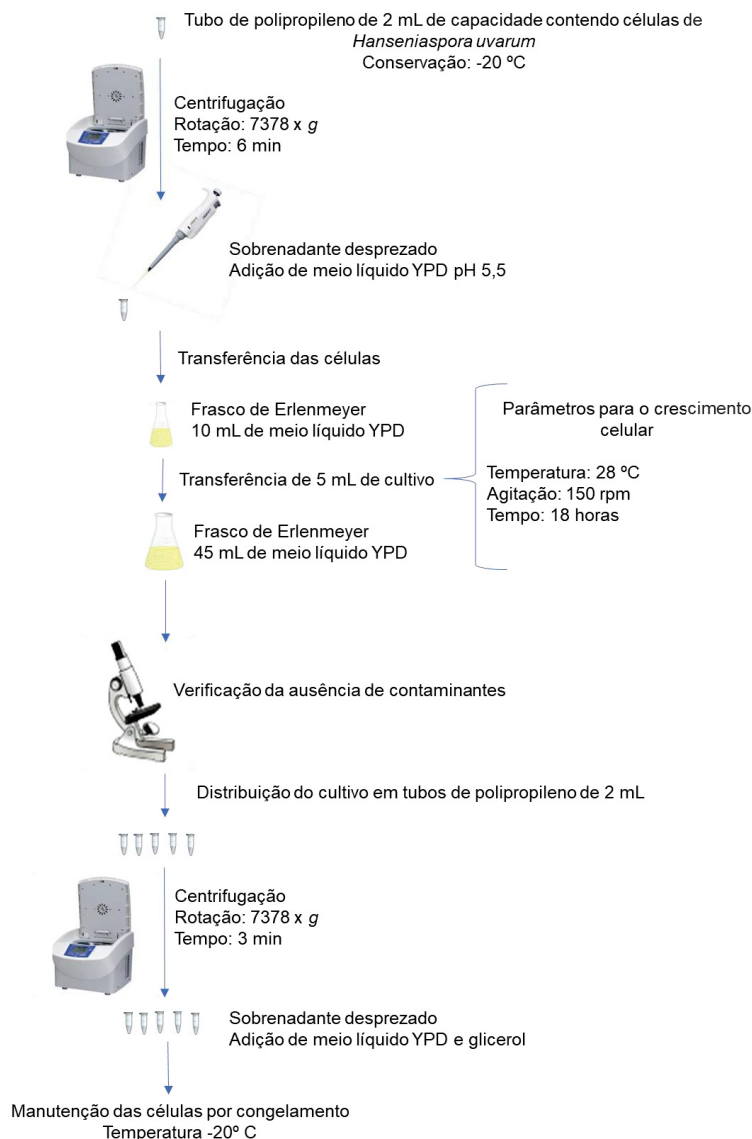
A reativação da cultura pura de células da levedura *Hanseniaspora uvarum* utilizada neste trabalho, foi efetuada pela transferência da suspensão das células conservadas contidas no microtubo para frasco de Erlenmeyer de 50 mL de capacidade, contendo 10 mL de meio líquido YPD pH 5,5 ± 0,005. O meio de cultura inoculado com as células descongeladas foi mantido em incubadora refrigerada de movimento orbital Novatécnica®, modelo NT 715, na temperatura de 28 °C e agitação 150 rpm.

Após a visualização do crescimento celular, foi inoculado 5 mL do cultivo da reativação em frasco de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 45 mL de meio líquido YPD pH 5,5 ± 0,005 (cujos nutrientes foram calculados para 50 mL) e novamente colocado na mesma incubadora refrigerada na temperatura de 28 °C, agitação de 150 rpm, durante 18 horas. Em seguida, foram verificadas a ausência de micro-organismos contaminantes no cultivo e as características microscópicas da levedura por técnica a fresco e coloração de Gram, conforme descrito por Tortora, Funke e Case (2012) e Bier (1980), respectivamente, utilizando microscópio ótico Olympus® CX41.

Logo após a constatação da ausência de contaminantes, o cultivo contendo células recém-crescidas foi distribuído em microtubos de polipropileno estéreis de 2 mL de capacidade, em cabine de segurança biológica Classe II Tipo B2

(Labconco), e centrifugados a 7378 x g durante 3 minutos em centrífuga SIGMA® 1 - 14 e o sobrenadante descartado. Ao precipitado de células foram adicionados 800 µL de meio líquido YPD pH 5,5 ± 0,005 e 200 µL de glicerol, agente crioprotetor. Os tubos contendo as células foram homogeneizados, congelados e mantidos na temperatura de -20 °C em freezer Consul®. Na figura 8 está demonstrada a representação esquemática da reativação, crescimento e conservação da levedura.

FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REATIVAÇÃO, CRESCIMENTO E CONSERVAÇÃO DA LEVEDURA *Hanseniaspora uvarum*.



FONTE: A autora (2019).

#### 4.4 INÓCULO - ESCALAS LABORATORIAL E INDUSTRIAL

Para elaborar os processos de vinificação de 2017 e 2018, os inóculos foram preparados a partir de um dos microtubos contendo as células da levedura *Hanseniaspora uvarum* conservadas por congelamento. As células da levedura foram reativadas e crescidas como descrito no item 4.3 no laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações da Universidade Federal do Paraná.

Depois do crescimento das células até o final da fase exponencial, 40 mL deste cultivo foi inoculado em frasco de Erlenmeyer de 2000 mL de capacidade, contendo 360 mL de meio líquido YPD pH  $5,5 \pm 0,005$  (cujos nutrientes foram calculados para 400 mL) e mantido em incubadora refrigerada de movimento orbital Tecnal®, modelo TE-421, a temperatura de 28 °C e agitação 150 rpm por 18 horas. Em seguida, estes 400 mL do cultivo foram transferidos para um fermentador New Brunswick Scientific Co modelo Drive Assembly em dorna de vidro de 5 L de capacidade, contendo 3,6 L de suco de uva *Vitis labrusca*, cultivar Bordô (fornecido pela vinícola) e mantidas as condições de 28 °C de temperatura, 300 rpm de agitação e 2 volumes de ar/volume de meio/minuto (vvm) de injeção de ar. O pH inicial do cultivo foi em torno de 3,8 e não houve ajustes de pH durante os cultivos. Quando necessário, fez-se o uso de anti-espumante simeticone (Dow Corning®).

No tempo de 18 horas, todo o cultivo foi retirado das dornas, e as células foram separadas do líquido por centrifugação em centrífuga da marca Eppendorf®, modelo 5810 R, 4000 rpm de agitação, a temperatura de 10 °C. As células obtidas foram lavadas com água destilada estéril para a remoção do sobrenadante residual e estocadas em frasco com tampa estéril, também contendo água destilada estéril em refrigerador Consul® a temperatura de 8 °C. O procedimento da etapa laboratorial foi repetido até que a quantidade necessária de células fosse conseguida para o início da etapa industrial do preparo do inóculo. Os tubos com as suspensões de células da levedura foram acondicionados em caixa térmica com gelo, e transportados para a vinícola.

A etapa industrial dos inóculos preparados em 2017 e 2018 foi desenvolvida na vinícola. Os cultivos desta etapa ocorreram em tanque de aço inox de 250 L de capacidade, da marca Sandrizzo. Os meios dos cultivos foram preparados com 200 kg de uva *Vitis labrusca* da cultivar Bordô. Inicialmente, as ráquis foram

separadas das uvas e somente depois esmagadas, com o uso de máquina desengaçadeira e esmagadeira (marca AGM, modelo DS 4000). Em seguida, aos mostos, foram adicionados 40 g de metabissulfito de potássio, previamente dissolvidos com os mesmos meios.

Para iniciar a etapa industrial dos preparos dos inóculos, 800 g de células úmidas da levedura foram transferidos para 20 L de mosto de uvas e mantidos com aeração, a temperatura de  $28 \pm 2$  °C. Após 24 horas, foram adicionados gradativamente aos 20 L de inóculo, em torno de 120 L de mosto de uvas e permaneceram nas mesmas condições de temperatura e aeração por aproximadamente 48 horas em 2017, e em 2018. Na figura 9 está demonstrada a representação esquemática das etapas laboratorial e industrial do preparo do inóculo.

FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DO INÓCULO - ESCALAS LABORATORIAL E INDUSTRIAL



FONTE: A autora (2019).

#### 4.5 MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima utilizada para a produção dos vinhos na vinícola em 2017 e 2018 foi uva *Vitis labrusca*, cultivar Bordô, proveniente da região de Bateias, Campo Largo (25°24'09.0"S 49°29'48.7"W) e de Palmeira (25°26'09.4" S 50°00'51.0"W), no estado do Paraná, respectivamente.

#### 4.6 ELABORAÇÃO DE VINHO TINTO

Em 2017 e 2018, na vinícola, foram elaborados vinhos tintos de mesa secos em tanques de fermentação de aço inox da marca Sandrizzo, com capacidades totais de 15.000 L e 25.000 L respectivamente, representados na figura 10. Os tanques de fermentação possuem um formato que possibilita maior contato entre o mosto e a parte sólida durante o processo de maceração. São dotados de sistema de refrigeração do mosto em fermentação para adequação da temperatura (cintas externas). Na parte inferior encontra-se uma pequena porta para retirada do bagaço por ocasião da descuba. Os tanques foram previamente higienizados com solução detergente e a assepsia efetuada com a solução sanitizante de ácido peracético 0,02% (v/v) (Qualimix).

FIGURA 10 - TANQUES UTILIZADOS PARA A PRODUÇÃO DO VINHO



FONTE: A autora (2019).

Assim que as uvas chegaram à vinícola, foram selecionadas, pesadas e calculados os volumes dos vinhos a serem elaborados e as quantidades dos insumos para as vinificações de 2017 e 2018. Pode-se prever, em média, de 65% a 70% do peso total das uvas em rendimento de vinho ao final do seu processo, segundo Amorim et al. (2006). Em 2017 foram utilizadas no preparo do mosto 12 toneladas de uva e em 2018, 22 toneladas.

Para iniciar a elaboração dos vinhos, foram preparados os mostos. As ráquis foram separadas das uvas e somente depois esmagadas, com o uso de máquina desengaçadeira e esmagadeira. O esmagamento das uvas consistiu em romper a película da baga com a finalidade de liberar o mosto contido no grão da uva. Logo após o esmagamento, os mostos foram remetidos para o tanque de fermentação e foram medidas as densidades iniciais de  $1.050 \text{ g.mL}^{-1}$  em 2017 e  $1.060 \text{ g.mL}^{-1}$  em 2018, utilizando densímetro de massa específica. O volume ocupado pelo mosto não ultrapassou 80% do espaço útil do tanque, para evitar o transbordamento por ocasião da fermentação alcoólica.

Todos os insumos utilizados nos mostos foram previamente dissolvidos numa pequena quantidade de mosto, e empregados conforme as orientações dos fabricantes. Nos mostos de uvas, foram acrescentados metabissulfito de potássio (Indupropil) na concentração de 20 g para cada 100 kg de uva em 2017 e 2018. Após duas horas nos mostos de uva preparados, foram adicionados os cultivos provenientes da etapa industrial do preparo do inóculo.

Durante a produção dos vinhos, no decorrer da primeira fermentação (fermentação alcoólica), segundo dia, foram acrescentados nos tanques de fermentação Actimax vit® (Coatec) e Gesferm Plus® (Coatec) nas concentrações de  $20 \text{ g.hL}^{-1}$  em 2017 e 2018.

Quando os mostos em fermentação atingiram os valores de densidade em torno de  $1.010 \text{ g.mL}^{-1}$  tanto em 2017 quanto em 2018, foram adicionados de sacarose de cana-de-açúcar para a correção do teor de açúcares totais, a fim de obter a graduação alcoólica estabelecida conforme a legislação vigente. (BRASIL, 2014).

Ao longo das fermentações foram feitas remontagens, que consistiram em retirar o mosto da parte inferior do tanque de fermentação e colocá-lo novamente na parte superior. No primeiro e segundo dias, foram feitas quatro remontagens, no terceiro e quarto dias, três remontagens, e no quinto dia, duas remontagens. As

fermentações alcoólicas ocorreram nas temperaturas de 18 a 22 °C durante 5 dias em 2017 e 6 dias em 2018.

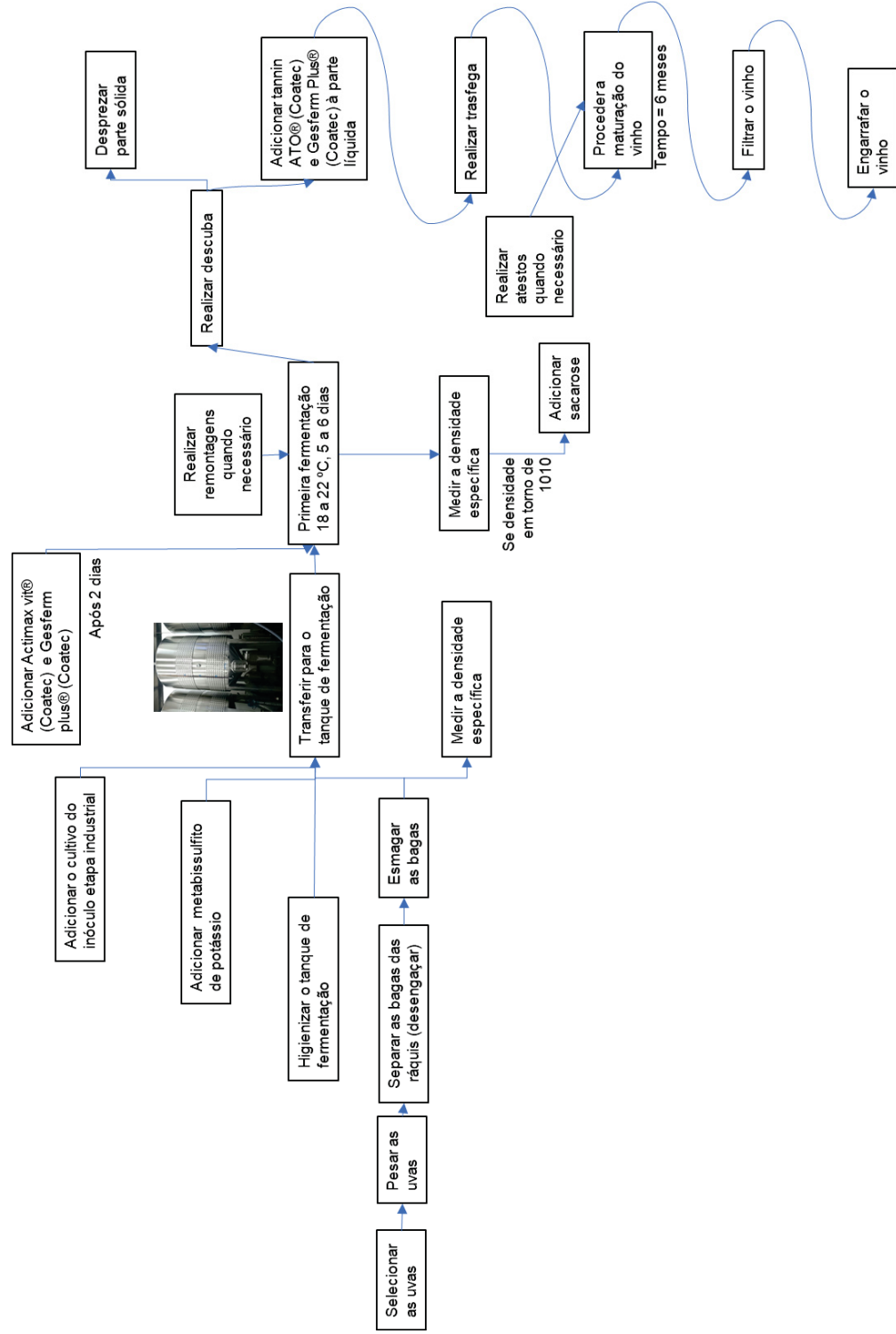
No término das fermentações alcoólicas, procedeu-se às descubas, que consistiram nas separações das partes sólidas e líquidas dos mostos. Foram adicionados tannin ATO® (Coatec) e Gesferm Plus® (Coatec) nas concentrações de 20 g.hL<sup>-1</sup> em 2017 e 2018.

Nos dois processos de vinificação foram feitas uma trasfega que consistiu em passar os vinhos de um tanque para outro tanque onde aconteceu o processo de maturação, que durou aproximadamente 6 meses. Durante este período, os tanques de fermentações foram preenchidos periodicamente com vinho sempre que se observava evaporação dos mesmos nos tanques, procedimento conhecido como atesto. No final de cada processo foram feitas as filtrações com terra diatomácea e os vinhos foram engarrafados.

Os valores obtidos de rendimento em vinho para o elaborado em 2017 e 2018 foram de 8000 e 15000 litros, respectivamente. A figura 11 representa o fluxograma do processo de elaboração de vinho tinto.



FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE VINHO TINTO



FONTE: A autora (2019).

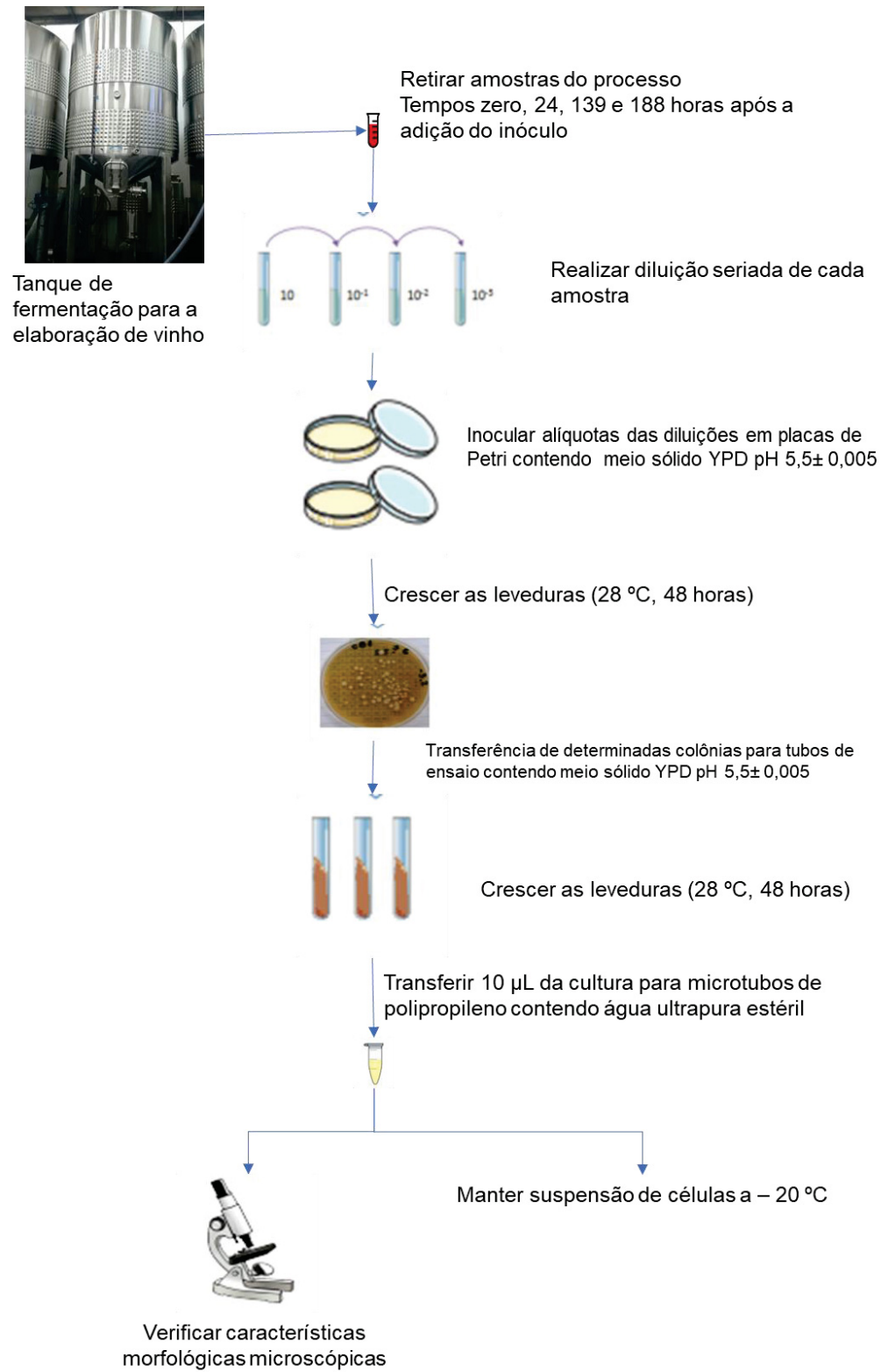
#### 4.7 ACOMPANHAMENTO MICROBIOLÓGICO NO PROCESSO DE VINIFICAÇÃO

Para confirmar a presença e/ou prevalência da levedura *Hanseniaspora uvarum* no processo de vinificação efetuado em 2018, foram retiradas amostras do tanque da etapa industrial do preparo do inóculo, assim como, do tanque de fermentação após a adição do inóculo (tempo zero), e depois de 24 horas, 139 horas e 188 horas. Também foram avaliadas as células crescidas na etapa laboratorial do preparo do inóculo.

Todas as amostras coletadas foram diluídas em uma série de tubos de diluição e em seguida, alíquotas de todas as diluições foram inoculadas na superfície de placas de Petri contendo meio sólido YPD pH  $5,5 \pm 0,005$  e distribuídas pelo método de espalhamento utilizando alça de Drigalski estéril, em cabine de segurança biológica Classe II Tipo B2 (Labconco). As placas com meio inoculadas foram colocadas em estufa microbiológica BOD Tecnal® TE-391 à temperatura de 28 °C durante 48 horas. As colônias isoladas com características macroscópicas de leveduras foram transferidas com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril para tubos contendo meio sólido YPD pH  $5,5 \pm 0,005$  e estes foram mantidos na mesma estufa à temperatura de 28 °C durante 48 horas.

Em seguida, foi transferida uma quantidade da cultura de cada tubo com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril de 10 µL, para microtubos de polipropileno de 2 mL de capacidade contendo 300 µL de água ultrapura estéril. As suspensões de células foram visualizadas para verificação das características morfológicas microscópicas com lâmina a fresco, em seguida, as imagens foram comparadas com a literatura. Posteriormente os tubos contendo as suspensões de células foram mantidos em freezer Consul® a -20 °C, para identificação. O procedimento de isolamento dos micro-organismos está representado na figura 12.

FIGURA 12 - ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DURANTE O PROCESSO DE VINIFICAÇÃO



FONTE: A autora (2019).

#### 4.7.1 Identificação dos micro-organismos isolados por PCR-RFLP

As identificações e diferenciações dos micro-organismos isolados nos processos de vinificação foram efetuadas nas dependências da Embrapa, unidade uva e vinho em Bento Gonçalves-RS.

Para a identificação taxonômica dos micro-organismos isolados, foi utilizada a técnica de PCR-RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*) da região ITS, conforme metodologia descrita por Agustini et al. (2014). Para tanto, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') para amplificar um fragmento de tamanho entre 300 a 900 pb compreendendo as regiões ITS1, rDNA 5.8S e ITS2.

Neste procedimento, a extração do material genômico dos micro-organismos isolados ocorreu pelo congelamento seguido do descongelamento de uma suspensão de células com concentração aproximada de  $10^9$  células.mL<sup>-1</sup>. Em seguida, as suspensões foram homogeneizadas e congeladas. Assim que ocorreu o congelamento, as mesmas foram descongeladas a temperatura ambiente e foram homogeneizadas durante 2 minutos, para então serem utilizadas na PCR. O meio reacional está representado na tabela 1.

TABELA 1 - REAGENTES EMPREGADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS DO rDNA NA REAÇÃO DE PCR

Reagente	Concentração final
Água ultrapura	qsp
Tris-HCl 100 mmol.L <sup>-1</sup> (Promega, USA)	20 mmol.L <sup>-1</sup>
Nucleotídeos trifosfatados (Sigma, USA) 1 mmol.L <sup>-1</sup>	100 µmol.L <sup>-1</sup>
Oligonucleotídeos iniciadores (Sigma, USA) (ITS1 e ITS4) 20 µmol.L <sup>-1</sup>	0,8 µmol.L <sup>-1</sup>
Cloreto de magnésio (Promega, USA) 25 mmol.L <sup>-1</sup>	1,5 mmol.L <sup>-1</sup>
Taq DNA polimerase (Promega, USA) 5 U.µL <sup>-1</sup>	1,5 U
DNA amostral	20-40 ng
Volume final	25 µL

FONTE: AGUSTINI et al. (2014).

As reações foram desenvolvidas em termociclador Applied Biosystems ProFlex. O programa utilizado foi: um ciclo de desnaturação na temperatura de 95°C por cinco minutos; 40 ciclos de 95°C por trinta segundos cada, 60°C por um minuto e 72 °C por um minuto; e um ciclo final de 72°C por 10 minutos.

A detecção dos produtos de PCR ocorreu por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) em solução tampão de TBE 1x (Tris 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 2 mM). Uma alíquota de 5 µL do produto de PCR foi homogeneizada com 1,5 µL do tampão de aplicação 6x (azul de bromofenol 0,25% (p/v), Promega, xileno cianol FF 0,25% (v/v) Promega, glicerol 30% (v/v) Promega) antes de ser depositada no gel. A separação dos *amplicons* foi obtida por eletroforese em sistema horizontal a 90 V com duração de 1 hora e 30 minutos. Como referência de tamanho molecular foi utilizado o marcador 100 pb (DNA *Ladder*, Invitrogen, Brasil).

O *amplicon* resultante foi digerido, de forma individual, com endonucleases de restrição, sendo elas: *CfoI* (5' C↓GCG3'), *HaeIII* (5' GG↓CC 3') *HinfI* (5' G↓CTNA 3'), *DdeI* (5' C↓TNAG 3'). As clivagens enzimáticas seguiram as orientações do fabricante (Promega) quanto ao tempo e ao meio reacional. A detecção dos fragmentos gerados pela ação das enzimas ocorreu por eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v) em solução tampão de TBE 1x. Todo o volume da reação, 10 µl, foi homogeneizado com 3,0 µL do tampão de aplicação 6x (azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno cianol FF 0,25% (v/v), glicerol 30% (v/v)) antes de ser aplicado no gel. Após o término da eletroforese, a revelação dos *amplicons* ou do perfil de fragmentação deste, procedeu-se à imersão do gel em brometo de etídeo a 0,5 µg.mL<sup>-1</sup> durante 30 minutos. A fotodocumentação ocorreu sob luz UV com comprimento de onda de excitação em 302 nm utilizando o programa Image Lab presente no equipamento Gel Doc XR+ (BioRad).

#### 4.7.2 Identificação dos micro-organismos isolados por PCR-RAPD

Para a técnica de PCR-RAPD (Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico, do inglês *Random Amplification of Polymorphic DNA*), foi utilizada a metodologia descrita por Teixeira et al. (2018). Foi utilizado o iniciador (GTG)<sub>5</sub>. O meio reacional está representado na tabela 2.

TABELA 2 - REAGENTES EMPREGADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO COM INICIADORES (GTG)<sub>5</sub>.

Reagente	Concentração final
Água ultrapura	qsp
Tris-HCl 100 mmol.L <sup>-1</sup> (Promega, USA)	20 mmol.L <sup>-1</sup>
Nucleotídeos trifosfatados (Sigma, USA) 1 mmol.L <sup>-1</sup>	200 µmol.L <sup>-1</sup>
Oligonucleotídeos iniciador (GTG) <sub>5</sub> (Sigma, USA) 20 µmol.L <sup>-1</sup>	1 µmol.L <sup>-1</sup>
Cloreto de magnésio (Promega, USA) 25 mmol.L <sup>-1</sup>	1,5 mmol.L <sup>-1</sup>
Taq DNA polimerase (Promega, USA) 5 U.µL <sup>-1</sup>	1,5 U
DNA amostral	20-40 ng
Volume final	25 µL

FONTE: AGUSTINI et al. (2014).

As condições de amplificação no termociclador foram: um ciclo de desnaturação na temperatura de 94 °C por cinco minutos; 40 ciclos de 94 °C por quinze segundos; 35 °C por quarenta e cinco segundos; 72 °C por 1 minuto e 30 segundos e um ciclo final de 72 °C por 4 minutos.

A detecção e fotodocumentação dos produtos amplificados sucedeu-se conforme a descrição no item 4.7.1.

#### 4.8 ANÁLISES DE PARÂMETROS ENOLÓGICOS

Os vinhos produzidos nas safras de 2017 e 2018 foram analisados quanto ao teor de açúcares, graduação alcoólica, valor de pH, acidez total, acidez volátil, sulfatos, anidrido sulfuroso total, extrato seco total e reduzido.

Cada análise foi efetuada em triplicata, com amostras representativas, para obter-se resultados estatisticamente significativos. Os resultados dos parâmetros enológicos foram expressos utilizando a média e o desvio padrão, com intervalo de confiança de 95%.

##### 4.8.1 Teor de açúcares totais

O teor de açúcares totais nos vinhos foi determinado de acordo com Método 13 do Manual Operacional de Bebidas e Vinagres do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para Fermentados Alcoólicos. (BRASIL, 2005). Neste método, os açúcares não redutores são hidrolisados em monossacarídeos em meio ácido. Estes monossacarídeos reagem com os íons cúpricos da solução de Fehling, reduzindo-os a íons cuprosos, sob a ação do calor em meio alcalino. Ao reagir com

os íons cúpricos, os açúcares sofrem oxidação, enquanto o íon Cobre (II) é reduzido a íon Cobre (I), formando-se um precipitado vermelho de óxido cuproso.

#### 4.8.2 Graduação alcoólica

A determinação do grau alcoólico dos vinhos foi efetuada segundo Método 03 do Manual Operacional de Bebidas e Vinagres do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para Fermentados Alcoólicos (BRASIL, 2005), utilizando para determinação de densidade relativa a 20 °C (Método 02), balança marca Bioprecisa®, modelo FA-2104N e picnômetro. A quantificação do álcool é feita primeiramente destilando-se a amostra para a separação do álcool, e posteriormente quantificando-o de acordo com a densidade relativa do destilado a 20 °C.

#### 4.8.3 Valor de pH

A medida do valor de pH nos vinhos foi obtida em concordância com o proposto no Método 04 do Manual Operacional de Bebidas e Vinagres do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para Fermentados Alcoólicos. (BRASIL, 2005). Método eletrometricopotenciométrico, utilizando pHmetro marca MS Tecnopon®, modelo mPA210.

#### 4.8.4 Acidez total

Esta determinação foi efetuada nos vinhos em conformidade com Método 05 do Manual Operacional de Bebidas e Vinagres do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para Fermentados Alcoólicos. (BRASIL, 2005). O método consiste em neutralizar os ácidos presentes nos vinhos, com solução básica padronizada até o ponto de equivalência, ou valor de pH igual a 8,2, medido em pHmetro marca MS Tecnopon® modelo mPA210.

#### 4.8.5 Acidez volátil

A acidez volátil foi quantificada nos vinhos conforme Método 06 do Manual Operacional de Bebidas e Vinagres do Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento, para Fermentados Alcoólicos. (BRASIL, 2005). O método fundamenta-se em destilar os ácidos voláteis da amostra por arraste a vapor d'água e titulá-los com solução de hidróxido de sódio. O dióxido de enxofre presente na amostra deve ser considerado e, portanto, deve-se titular com solução de iodo para a correção do valor da acidez. As amostras foram destiladas por arraste a vapor em aparelho marca Tecnal® Modelo TE-0871.

#### 4.8.6 Acidez fixa

Os valores de acidez fixa nos vinhos foram obtidos pelos cálculos das diferenças entre os valores de acidez total e volátil, como descrito no Método 07 do Manual Operacional de Bebidas e Vinagres do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para Fermentados Alcoólicos (BRASIL, 2005).

#### 4.8.7 Sulfatos

A análise qualitativa de sulfatos presentes nos vinhos foi efetuada como referido no Método 19 do Manual Operacional de Bebidas e Vinagres do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para Fermentados Alcoólicos. (BRASIL, 2005). Utiliza-se uma solução de concentração conhecida de cloreto de bário para que os íons sulfato presentes na amostra precipitem.

#### 4.8.8 Dióxido de Enxofre Total

O dióxido de enxofre total foi quantificado nos vinhos com base no Método 16 do Manual Operacional de Bebidas e Vinagres do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para Fermentados Alcoólicos (BRASIL, 2005). A amostra é previamente hidrolisada com ácido forte, e posteriormente o dióxido de enxofre é separado por destilação e recolhido em uma solução de iodo. O iodo residual é titulado com solução de tiosulfato de sódio.

#### 4.8.9 Extrato seco total e extrato seco reduzido



Os valores de extrato seco e extrato seco reduzido nos vinhos foram obtidos considerando os Métodos 08 e 09, respectivamente, do Manual Operacional de Bebidas e Vinagres do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para Fermentados Alcoólicos. (BRASIL, 2005).

O extrato seco é calculado pela fórmula de Taberié, pela diferença entre o valor da densidade relativa do vinho e o valor da densidade relativa do vinho desalcoholizado. O extrato seco reduzido calcula-se pelo valor de extrato seco total diminuído dos açúcares presentes na amostra e dos sulfatos, ambos que excedem  $1 \text{ g.L}^{-1}$ .

#### 4.9 ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

Os compostos voláteis quantificados foram álcoois superiores (1-propanol; 2-Metil,1-Propanol; 3-Metil,1-Butanol), aldeído acético e acetato de etila, nas dependências da Embrapa, unidade uva e vinho, Bento Gonçalves-RS, em equipamento GC Autosystem XL Perkin Elmer, de Cromatografia a gás, utilizando metodologia descrita por Agilent Technologies (2015).

Na determinação dos compostos foi empregada a fase estacionária Polietileno Glicol WAX da Perkin Elmer e uma coluna de 50 m de comprimento (CP-Wax 57 CB fused sílica, Varian). O gás de arraste foi gás Hélio, a uma pressão de 30 psi e a razão do Split foi de 1:50.

As temperaturas utilizadas foram de 40 a 200 °C para o forno, de 220 °C para o injetor e de 250 °C para o detector FID. O fluxo de hidrogênio foi de  $45 \text{ mL.min}^{-1}$  e o fluxo de ar sintético de  $450 \text{ mL.min}^{-1}$ .

A calibração foi feita com uso de padrão interno 4-metil-2-pentanol e cada amostra foi injetada em triplicata.

#### 4.10 ANÁLISE DE RESVERATROL

A determinação de resveratrol também foi efetuada nas dependências da Embrapa, unidade uva e vinho, Bento Gonçalves-RS, em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Shimadzu®, modelo FRC-10A, constituído pelos módulos: SPD-M10A referente ao detector de arranjo de diodos, CBM-20A referente ao controlador, e dois módulos LC-10 AD referente às bombas. A

metodologia utilizada encontrou fundamentos em Da Silva et al. (2017), com adaptações.

As amostras foram preparadas utilizando cartucho de extração em fase sólida SPE Strata-X-C (Phenomenex; 200 mg.3 mL<sup>-1</sup>), para retirar os compostos com carga positiva, como por exemplo as antocianinas, as quais poderiam interferir na determinação.

O padrão de *trans*-resveratrol (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) foi dissolvido em metanol. As soluções foram armazenadas em temperatura de - 20 °C, ao abrigo da luz. As soluções de trabalho foram preparadas após diluição da solução padrão utilizando metanol (Vetec) a 30% (v/v).

As condições cromatográficas empregadas foram: eluição gradiente com fase móvel constituída por (A) ácido fórmico grau HPLC (Fluka) e água ultrapura (1:1000, v/v), e (B) metanol (Vetec), ácido fórmico (Fluka) e água ultrapura (900:1:100, v/v/v). Coluna cromatográfica C8 150 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm e tamanho de poro 10 µm marca VertiSep UPS, Vertical. Fluxo de 1mL.min<sup>-1</sup>. Injeção de amostra de 20 µl. Detecção em 306 nm. O gradiente seguiu a seguinte proporção (v/v): de 30% a 45% de B em 7 min, 45% de B por 7 min, de 45% a 55% de B em 1 min, de 55% a 65% de B em 9 min, de 65% a 90% de B em 1 min, 90% de B por 2 min, de 90% a 30% de B em 0,5 min, e 30% de B por 2,5 min. Tempo total 30 min.

Cada amostra foi eluída em triplicata. O composto presente nas amostras foi identificado pela comparação com os tempos de retenção do padrão e por análise do perfil espectral (UV).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dentre os fatores que interferem na obtenção de vinhos tintos de qualidade, destacam-se a escolha do terreno, da videira e do porta-enxerto, do sistema de condução e do manejo da produtividade, além das condições climáticas dos vinhedos, que por sua vez, permitem adequada maturação das uvas. As características iniciais da uva e o vinho que se pretende obter, influenciam na escolha das técnicas enológicas a serem empregadas, e a elaboração do vinho deverá ser direcionada a valorizar a potencialidade e tipicidade que cada região pode proporcionar ao vinho, de acordo com Amorim et al. (2006).

### 5.1 ELABORAÇÃO DE VINHO TINTO

Os vinhos tintos de mesa secos produzidos em 2017 e 2018 foram elaborados com uvas *Vitis labrusca* cultivar Bordô do estado do Paraná, maduras, frescas, isentas de resíduos provenientes do recipiente do armazenamento e do transporte.

A separação da ráquis e esmagamento foram os primeiros tratamentos mecânicos aplicados à uva, pois exercem grande influência na qualidade do vinho.

Embora os processos de vinificação possam ocorrer pelas leveduras naturalmente presentes nas cascas das uvas, nestes processos foram adicionadas leveduras autóctones nos mostos, logo após a incorporação do metabissulfito de potássio, visando uniformidade na fermentação alcoólica. Os volumes de inóculo utilizados corresponderam a 2% (v/v) e 1% (v/v) do volume total do mosto a ser fermentado em 2017 e 2018, respectivamente. Conforme descrito por Da Silva (2003), deve-se usar o inóculo líquido na proporção de 2% (v/v) a 5% (v/v) do volume total do mosto a ser fermentado. Segundo Ribéreau-Gayon et al. (2006), a baixa concentração de células de leveduras inoculadas no mosto com elevadas concentrações de açúcares pode ocasionar parada de fermentação, o que se constituiria em um problema.

As remontagens foram feitas visando a manutenção da atividade e o crescimento das leveduras, assim como a extração dos componentes da parte sólida da uva presentes nos mostos. De acordo com Rizzon; Dall'Agnol (2007), as

remontagens auxiliam na incorporação de oxigênio ao mosto no momento adequado. Porém, é um desafio avaliar a quantidade de oxigênio dissolvido na remontagem. No mosto em contato com o ar a quantidade máxima de oxigênio dissolvida é de 8 mg.L<sup>-1</sup>.

As leveduras assimilam de 30% a 46% de nitrogênio total durante a fermentação. A maior parte é utilizada logo após o início da fermentação. Os compostos nitrogenados do mosto e do vinho desempenham um papel importante na fermentação, clarificação e na potencial instabilidade microbiana. Influem no desenvolvimento do aroma e do buquê do vinho, como descrito por Zoecklein et al. (2001). A correção do teor de nitrogênio evita fermentações lentas e incompletas e é necessária quando os valores de nitrogênio assimilável estão abaixo de 150 mg.L<sup>-1</sup>. O teor de nitrogênio recomendado no início da fermentação é de 300 mg.L<sup>-1</sup>, nas pesquisas de Zoecklein et al. (2001) e Dorneles et al. (2005).

Com base no resultado obtido por Dorneles et al. (2005), de 84 mg.L<sup>-1</sup> de nitrogênio total em mosto de uvas *Vitis labrusca* cultivar Bordô do estado do Paraná, é rotineira a adição do coadjuvante de tecnologia Actimax vit<sup>®</sup> de acordo com a legislação (BRASIL, 2016), pelo enólogo da vinícola parceira, durante o período da fermentação alcoólica. Segundo os dados do fabricante, este produto é um autolisado de leveduras constituído por aminoácidos, vitaminas, minerais e cofatores metabólicos de leveduras e bactérias lácticas. Proporciona uma importante fonte de nitrogênio orgânico em forma de aminoácidos primários, de assimilação lenta. Corrige a falta de nitrogênio do mosto sem riscos de subida de temperatura nem de desvios sensoriais.

Também durante a fermentação alcoólica, foram adicionados aos vinhos o coadjuvante de tecnologia Gesferm plus<sup>®</sup>, permitido pela legislação vigente (BRASIL, 2016), seguindo o protocolo de rotina da vinícola. De acordo com o fabricante, este produto é constituído por fosfato, celulose e vitamina B1, os quais são fontes de energia e fatores de crescimento, que favorecem a multiplicação celular e a atividade fermentativa das leveduras.

Após a descuba foi adicionado o coadjuvante de tecnologia Tanin ATO<sup>®</sup> conforme a legislação (BRASIL, 2016), que segundo o fabricante, é utilizado para evitar a oxidação e a autocondensação de antocianinas e auxilia na extração dos componentes de cor da casca da uva. Então os vinhos foram transferidos para o tanque de maturação. A complementação das fermentações alcoólicas, fermentação

lenta, nos vinhos tintos ocorreu durante a maturação, a qual foi concluída quando cessou o desprendimento de dióxido de carbono e o teor de açúcar total foi inferior a  $3 \text{ g.L}^{-1}$ .

A etapa final dos processos de elaboração dos vinhos consistiu no engarrafamento. Em 2017 o rendimento foi de aproximadamente 10.600 garrafas e em 2018 foi em torno de 20.000 garrafas. O rendimento em vinho varia em função da cultivar, do ano, da época de colheita, do tamanho das bagas, da compactação dos cachos, entre outros fatores. (AMORIM et al., 2006). Os vinhos não foram submetidos ao envelhecimento.

## 5.2 ACOMPANHAMENTO MICROBIOLÓGICO NO PROCESSO DE VINIFICAÇÃO

Nos processos de vinificação do presente estudo, os preparos dos inóculos em escalas laboratorial e industrial ocorreram em reatores com a mesma geometria, no entanto, a relação área/volume se modificou pelo fato de se aumentar o tamanho do reator, o que implicou numa transferência de oxigênio superficial praticamente desprezível no inóculo escala industrial. Outro aspecto que se alterou com a mudança da escala laboratorial para industrial foi a pressão hidrostática. De acordo com Pereira Jr (2008), em biorreatores industriais, a pressão no fundo do tanque pode assumir várias atmosferas, enquanto em biorreatores de laboratório ou piloto, a diferença de pressão entre a superfície e o fundo do tanque é mínima. Isto afeta a solubilidade do oxigênio e mesmo de gases do metabolismo celular, como o dióxido de carbono. Considerando a influência da ampliação das escalas durante os processos de vinificação no crescimento celular, foram efetuadas identificações dos micro-organismos isolados do inóculo nas escalas laboratorial e industrial e da fermentação.

### 5.2.1 Inóculo

Para identificação dos micro-organismos presentes no inóculo no final da etapa laboratorial, foi utilizada a técnica de PCR-RFLP, de acordo com o item 4.7.1, página 50. Neste procedimento o produto da amplificação com o uso dos oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 foi submetido à restrição enzimática utilizando as endonucleases *CfoI* e *DdeI*.

O produto da PCR apresentou 770 pares de base (pb). Com o uso da enzima *CfoI*, o perfil de fragmentação observado foi 320, 315 e 105 pb. Já, a enzima de restrição *DdeI* apresentou quatro fragmentos, 300, 170, 90 e 80 pb. Os autores Agustini et al. (2014) obtiveram o mesmo padrão de fragmentação para a levedura *Hanseniaspora uvarum*, confirmando a identidade da levedura autóctone selecionada para ser utilizada nos processos de vinificação do presente estudo.

No término da etapa industrial do preparo do inóculo, após a coleta de amostra e dos procedimentos de isolamento e seleção, as colônias foram identificadas. Foram isoladas 35 colônias denominadas de 1 a 35, submetidas à técnica de PCR-RFLP e os resultados e sua comparação com a literatura estão representados na tabela 3.

TABELA 3 - IDENTIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS ISOLADAS DA ETAPA INDUSTRIAL DO INÓCULO

Colônias Número de Referência	Espécies	Produto da PCR (pb)	Fragmentos de restrição			Referência
			<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	
1 a 35	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	850	360,320,130	320,240,180, 130	--	<b>Presente estudo</b>
--	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	370, 325, 140	310, 220, 170, 125	370, 360, 120	AGUSTINI et al., (2014)
--	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	340,320,120	320,240, 180,140	390,390, 100	PHAM et al. (2011)

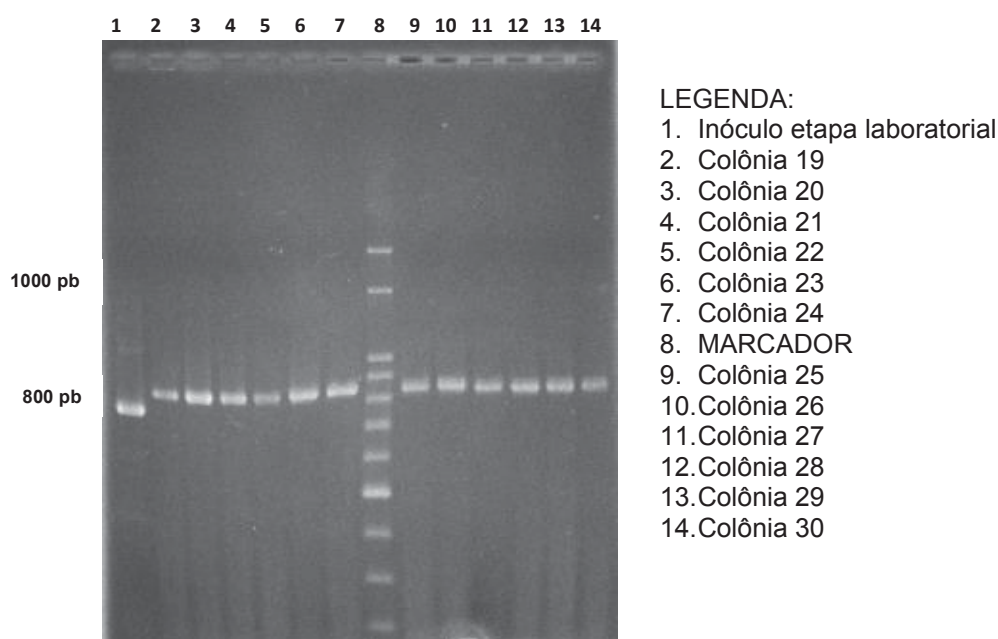
FONTE: A autora (2019).

Todas as colônias apresentaram tamanho do *amplicon* de aproximadamente 850 pares de base. Apenas o tamanho do *amplicon* não é suficiente para diferenciar as espécies de leveduras ao empregar oligonucleotídeos universais como é o caso do ITS1 e ITS4. Isso ocorre porque, muitas espécies apresentam o mesmo tamanho do *amplicon* em pares de base (pb), portanto, utilizam-se as endonucleases de restrição para efetivamente alcançar a identidade delas por meio da comparação com outros estudos na literatura. Após serem submetidas à enzima de restrição *CfoI*, observaram-se três fragmentos nos tamanhos 360, 320 e 130 pb e quando submetidas à enzima de restrição *HaeIII*, observaram-se quatro fragmentos nos seguintes tamanhos 320, 240, 180 e 130 pb.

Agustini et al. (2014) obtiveram padrões de fragmentação semelhantes para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* com as enzimas *CfoI*: 370, 325 e 140 pb e

*HaeIII*: 310, 220, 170 e 125 pb. Pham et al. (2011) também encontraram fragmentos de tamanhos semelhantes para esta levedura com a enzima *CfoI*: 340, 320 e 120 pb, e com a enzima *HaeIII*: 320, 240, 180 e 140 pb. Os resultados das reações de PCR da amostra do inóculo etapa laboratorial e das colônias isoladas do inóculo da etapa industrial denominadas de 19 a 30, estão representados na figura 13.

FIGURA 13 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE PRODUTOS DE PCR EMPREGANDO OS INICIADORES ITS1 E ITS4 PARA AS LEVEDURAS ISOLADAS DO INÓCULO ETAPAS LABORATORIAL E INDUSTRIAL



FONTE: A autora (2019).

NOTA: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), em tampão TBE 1X. Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen). Gel corado com brometo de etídeo.

Inoculações com leveduras não-*Saccharomyces* em ambientes de vinícolas são muito mais desafiadores em virtude das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* residentes, e, de fato, foi visualizado um preparo de inóculo industrial prolongado, que deu condições para as leveduras residentes se instalarem.

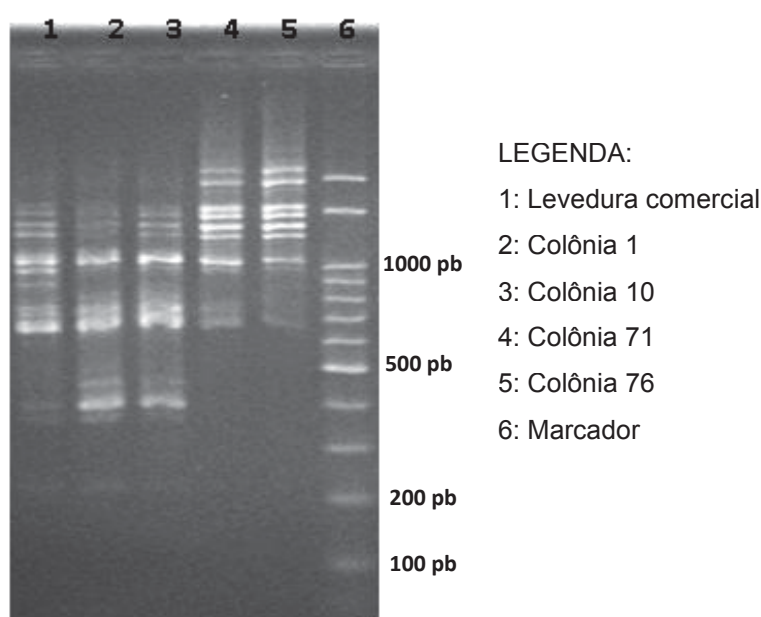
Para confirmar este resultado, foi efetuada outra análise de identificação molecular, conhecida como PCR-RAPD. Este recurso é largamente utilizado para a diferenciação de linhagens de leveduras. Nesta pesquisa foi empregado o iniciador (GTG)<sub>5</sub> para diferenciação, a fim de comparar a linhagem da levedura identificada no término da etapa industrial do inóculo com a linhagem da levedura comercial seca



ativa *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada frequentemente nos processos de vinificação na vinícola.

Os resultados da identificação pela técnica de PCR-RAPD, representados na figura 14, demonstram que os perfis de identificação das colônias 1 e 10, isoladas do final da etapa industrial do inóculo são semelhantes ao perfil de identificação da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (Coatec). Estes resultados sugerem que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial pode estar presente nas superfícies internas dos tanques da vinícola e se sobrepôs à levedura *Hanseniaspora uvarum*. Isso pode ter ocorrido, em razão de os tanques terem sido higienizados com solução sanitizante e não esterilizados. As colônias 71 e 76 também são linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que se apresentaram ao longo do processo de vinificação, provavelmente oriundas da própria microflora da uva utilizada.

FIGURA 14 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE PRODUTOS DE PCR-RAPD EMPREGANDO O INICIADOR (GTG)<sub>5</sub> COM LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae*.



FONTE: A autora (2019).

NOTA: Eletroforese em gel de agarose a 1,8% (p/v), em tampão TBE 1X. Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen). Gel corado com brometo de etídeo.

Estudos anteriores desenvolvidos por Bokulich et al. (2013) e Aranda et al. (2011) demonstraram que leveduras associadas a equipamentos e ambientes de vinícolas apresentam principalmente leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. A



colonização de ambientes de vinícolas por leveduras foi previamente reportada nos trabalhos de Bokulich et al. (2013), os quais identificaram outras leveduras além de *Saccharomyces cerevisiae*, principalmente *Hanseniaspora uvarum* e *Cryptococcus spp.* Os autores relataram que estes micro-organismos provavelmente desempenham um importante papel na fermentação dos vinhos, principalmente nas fermentações espontâneas.

Blanco et al. (2011) e Clavijo et al. (2011) comprovaram que leveduras comerciais frequentemente utilizadas tornam-se parte da ecologia da vinícola, adaptam-se perfeitamente e podem permanecer por longos períodos nas superfícies dos tanques de fermentação. Estas leveduras do ambiente são capazes de efetuar as fermentações do início ao fim, e prevalecer sobre as leveduras do mosto, dificultando o seu crescimento.

Martiniuk et al. (2016) também demonstraram a presença de leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae* nas vinificações, mesmo sem ser inoculada nos mostos, evidenciando que estas leveduras permanecem nos ambientes das vinícolas.

### 5.2.2 Fermentação

Para verificar os micro-organismos presentes no processo, foram isoladas colônias, selecionadas e identificadas, no início (tempo zero), e depois de 24 horas, 139 horas e 188 horas da adição do inóculo no tanque de fermentação.

Na amostra do tempo zero, foram isoladas e identificadas 18 colônias denominadas com os números de 36 a 53, e todas foram submetidas à técnica de PCR-RFLP. Os resultados das identificações e a comparação com a literatura estão apresentados na tabela 4.

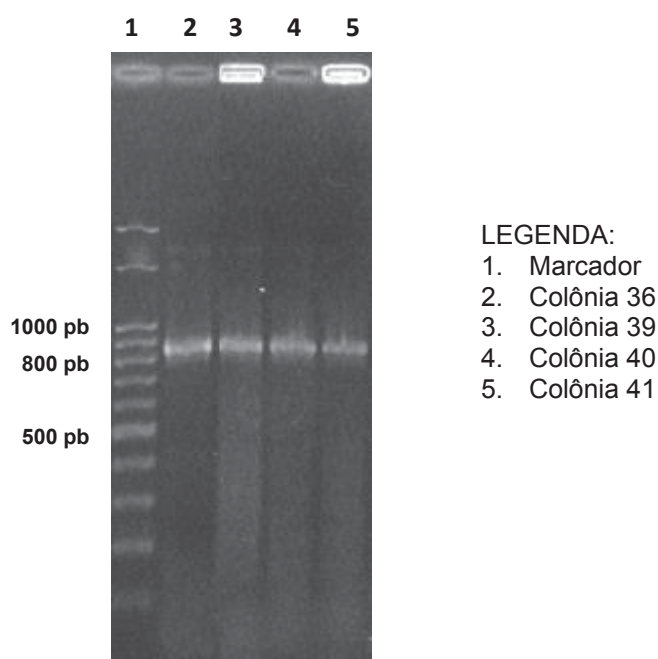
TABELA 4 - TAMANHO DOS AMPLICONS E DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS DO TEMPO ZERO HORA

Colônias Número de Referência	Espécies	Produto da PCR (pb)	Fragmentos de restrição				Referência
			Cfol	HaeIII	HinfI	Ddel	
36 a 44	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	850	360,320,130	320,240,180,130	--	--	Presente estudo
--	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	370, 325, 140	310, 220, 170, 125	370, 360, 120	--	AGUSTINI et al., (2014)
--	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	340,320,120	320,240,180,140	390,390,100	--	PHAM et al. (2011)
45,47, 49	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750	--	--	340, 190, 160	300, 180, 90, 80	Presente estudo
50, 53	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750	--	--	--	300, 170, 90, 80	Presente estudo
--	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750	--	--	340, 190, 160	300, 170, 90, 80	AGUSTINI et al., (2014)
46	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	750	--	--	340, 190, 160	380, 180, 90, 80	Presente estudo
51, 52	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	750	320, 310, 105	--	--	380, 170, 90, 80	Presente estudo
--	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	750	320, 315, 105	--	340, 180, 160	--	AGUSTINI et al., (2014)
--	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	750	--	--	--	380, 170, 90, 90	WANG;LIU (2013)
48	<i>Candida californica</i>	450	220, 105, 80, 70	290, 80, 60	240, 210	--	Presente estudo
--	<i>Candida californica</i>		210,100,80,70	300,80,40	230, 200	--	AGUSTINI et al., (2014)

FONTE: A autora (2019).

De acordo com os dados da tabela 4 e ilustrado na figura 15, as colônias números 36, 39, 40, 41 apresentaram tamanho do *amplicon* de aproximadamente 850 pares de base, assim como, as colônias 37, 38, 42, 43 e 44. Após serem submetidas à enzima de restrição *CfoI*, observou-se três fragmentos de 360, 320 e 130 pb, e em seguida ao uso da enzima de restrição *HaeIII*, verificou-se quatro fragmentos de 320, 240, 180 e 130 pb. Estes perfis são condizentes com os resultados de Agustini et al. (2014), que conseguiram padrões de fragmentação semelhantes para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, com as enzimas *CfoI*: 370, 325 e 140 pb e *HaeIII*: 310, 220, 170 e 125 pb. Os estudos de Pham et al. (2011) também revelaram fragmentos de tamanhos semelhantes para esta levedura utilizando a enzima *CfoI*: 340, 320 e 120 pb, e com a enzima *HaeIII*: 320, 240, 180 e 140 pb.

FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE PRODUTOS DE PCR EMPREGANDO OS INICIADORES ITS1 E ITS4 PARA AS LEVEDURAS ISOLADAS DO TEMPO ZERO



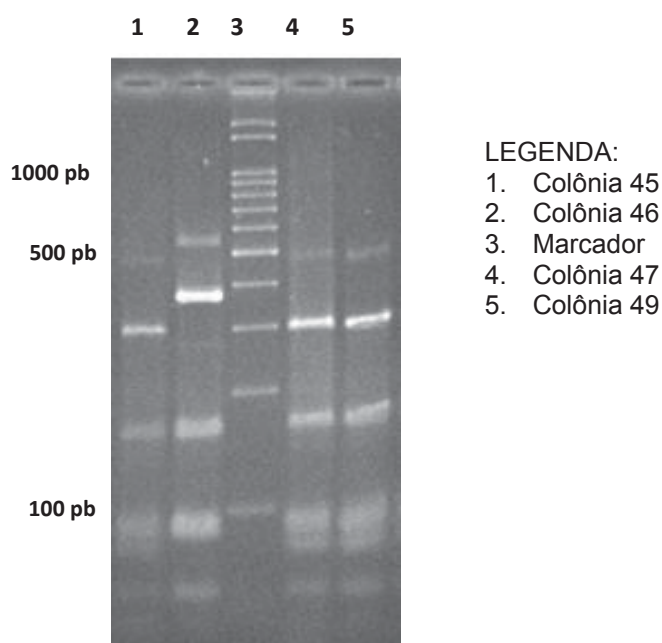
FONTE: A autora (2019).

NOTA: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), em tampão TBE 1X. Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen). Gel corado com brometo de etídeo.

As colônias denominadas 45, 47, 49, 50 e 53 apresentaram tamanho do *amplicon* de aproximadamente 750 pb. As colônias de números 45, 47 e 49, depois de serem submetidas à enzima de restrição *Hinfl*, exibiram três fragmentos de 340,

190 e 160 pb, e com o uso da enzima de restrição *Ddel*, foi verificado quatro fragmentos de 300, 180, 90 e 80 pb, demonstrado na figura 16. Agustini et al. (2014) obtiveram este mesmo padrão de fragmentação com a enzima *Hinfl*, para a levedura *Hanseniaspora uvarum*. Utilizando a enzima *Ddel* estes autores conseguiram 300, 170, 90 e 80 pb.

FIGURA 16 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS DA FERMENTAÇÃO - TEMPO ZERO HORA, UTILIZANDO A ENZIMA *Ddel*



FONTE: A autora (2019).

NOTA: Eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v), em tampão TBE 1X. Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen). Gel corado com brometo de etídeo.

As colônias números 50 e 53 apresentaram perfil de fragmentação após o uso da enzima *Ddel*, de 300, 170, 90 e 80 pb. Agustini et al. (2014) obtiveram padrão de fragmentação semelhante para a levedura *Hanseniaspora uvarum*, utilizando a enzima *Ddel*: 300, 170, 90 e 80 pb.

As colônias denominadas 46, 51, 52 apresentaram tamanho de *amplicon* de aproximadamente 750 pb. As colônias números 51 e 52 foram submetidas à enzima de restrição *CfoI* e exibiram três fragmentos de 320, 310 e 105 pb, e depois do uso da enzima de restrição *Ddel*, foram verificados quatro fragmentos de 380, 170, 90 e 80 pb. Agustini et al. (2014) conseguiram padrões de fragmentação semelhantes para a levedura *Hanseniaspora opuntiae* com a enzima *CfoI*: 320, 315 e 105 pb. Os resultados de 380, 170, 90 e 90 pb alcançados neste trabalho para esta levedura,

utilizando a enzima de restrição *Ddel* são semelhantes aos demonstrados pelos autores Wang; Liu (2013).

De acordo com os resultados da tabela 4, a colônia número 46 apresentou três fragmentos de 340, 190 e 160 pb após ser submetida à enzima de restrição *Hinfl*, semelhante ao encontrado por Agustini et al. (2014). Os autores demonstraram 340, 180 e 160 pb para *Hanseniaspora opuntiae* com esta enzima. Quando submetida à enzima de restrição *Ddel*, a colônia número 46 exibiu quatro fragmentos de 380, 180, 90 e 80 pb, representado na figura 16, página 66, conforme esperado segundo Wang; Liu (2013) que obteve 380, 170, 90 e 90 pb para *Hanseniaspora opuntiae* com esta enzima.

Conforme demonstrado na tabela 4, página 64, a colônia número 48 apresentou 450 pb. Quando submetida à enzima de restrição *CfoI* mostrou quatro fragmentos de 220, 105, 80 e 70 pb. Utilizando a enzima de restrição *HaeIII* verificaram-se três fragmentos de 290, 80 e 60 pb e após o uso da *Hinfl*, observaram-se dois fragmentos de 240, 210 pb. Os resultados conseguidos no presente trabalho são semelhantes aos de Agustini et al. (2014) que para a levedura *Candida californica*, utilizando a enzima *CfoI*, obtiveram 210, 100, 80 e 70 pb. Para a enzima *HaeIII* demonstraram 300,80 e 40 pb, e para a enzima *Hinfl* verificaram 230, 200 pb.

Esta diversidade de leveduras encontradas é esperada, devido à grande quantidade de micro-organismos presentes na microflora da uva, uma vez que o mosto é apenas desinfetado com metabissulfito de potássio. Leveduras não-*Saccharomyces* são frequentemente encontradas na microflora da uva. Estudos recentes de Baffi et al. (2011); Drumonde-Neves et al. (2016) e Gaensly et al. (2015) demonstraram a presença de *Hanseniaspora uvarum* como predominante em uva *Vitis labrusca*, da cultivar Bordô, como também em outras cultivares, conforme aponta Aranda et al. (2011).

Segundo Manzanares et al. (2011) leveduras do gênero *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Candida* e *Saccharomyces cerevisiae* (em menor proporção) são usualmente encontradas nos estágios iniciais da fermentação alcoólica.

O micro-organismo *Hanseniaspora uvarum* também foi encontrado nas pesquisas de Raymond Eder et al. (2017) nos estágios iniciais da fermentação utilizando uva *Vitis labrusca*, assim como a *Candida californica*, que é bastante

comum em uvas *Vitis labrusca*, mas não em uva *Vitis vinifera*. Moreira et al. (2011) do mesmo modo evidenciaram a presença de leveduras não-*Saccharomyces*, inclusive as do gênero *Hanseniaspora*, as quais sobreviveram até o quinto dia de fermentação.

As leveduras *Hanseniaspora opuntiae* e *Saccharomyces cerevisiae* isoladas e identificadas no presente trabalho, também foram descritas por Gaensly et al. (2015). Os pesquisadores isolaram além destas, as leveduras *Candida zemplinina*, *Zygoascus meyeri*, e *Zygosaccharomyces bailii*, de uvas cultivar Bordô do estado do Paraná.

Nas uvas da espécie *Vitis labrusca*, cultivar Bordô foram encontrados os micro-organismos *Issatchenkia occidentalis*, *Issatchenkia terricola*, *Aureobasidium pullulans*, *Sporidiobolus pararoseus*, conforme Baffi et al. (2011), *Pichia terricola*, *Starmerella bacillaris*, *Issatchenkia hanoiensis*, de acordo com Drumonde-Neves et al. (2016).

No tempo zero hora, a levedura isolada *Saccharomyces cerevisiae* (tabela 4) identificada, possivelmente foi originada do inóculo resultante da etapa industrial, conforme a técnica de PCR-RAPD apresentou.

Nas fermentações espontâneas, sem adição de inóculo, nos estágios iniciais, a proporção de leveduras *Saccharomyces* é menor do que leveduras não-*Saccharomyces* de acordo com Raymond Eder et al. (2017).

Após 24 horas da adição do inóculo no tanque de fermentação, já havia desprendimento de gás carbônico no tanque, indicando que estava ocorrendo a fase tumultuosa da fermentação alcoólica. Neste tempo foram isoladas 17 colônias (números 54 a 70) e todas foram submetidas à técnica de PCR-RFLP. Os resultados e a comparação com a literatura estão apresentados na tabela 5.

TABELA 5 - TAMANHO DOS AMPLICONS E DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS DO TEMPO 24 HORAS

Colônias Número de Referência	Espécies	Produto da PCR (pb)	Fragmentos de restrição				Referência
			CfoI	HaeIII	HinfI	DdeI	
54, 57	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750	--	--	340, 190, 160	300, 180, 90, 80	Presente estudo
55, 56	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750	--	--	--	300, 170, 90, 80	Presente estudo
59, 60	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750	--	--	--	300, 170, 90, 80	Presente estudo
--	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750	--	--	340, 190, 160	300, 170, 90, 80	AGUSTINI et al., (2014)
58	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	750	--	--	--	380, 170, 90, 80	Presente estudo
--	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	750	--	--	--	380, 170, 90, 90	WANG; LIU (2013)
61 a 70	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	850	--	320, 240, 180, 130	--	--	Presente estudo
--	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	370, 325, 140	310, 220, 170, 125	370, 360, 120	--	AGUSTINI et al., (2014)
--	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	340, 320, 120	320, 240, 180, 140	390, 390, 100	--	PHAM et al. (2011)

FONTE: A autora (2019).

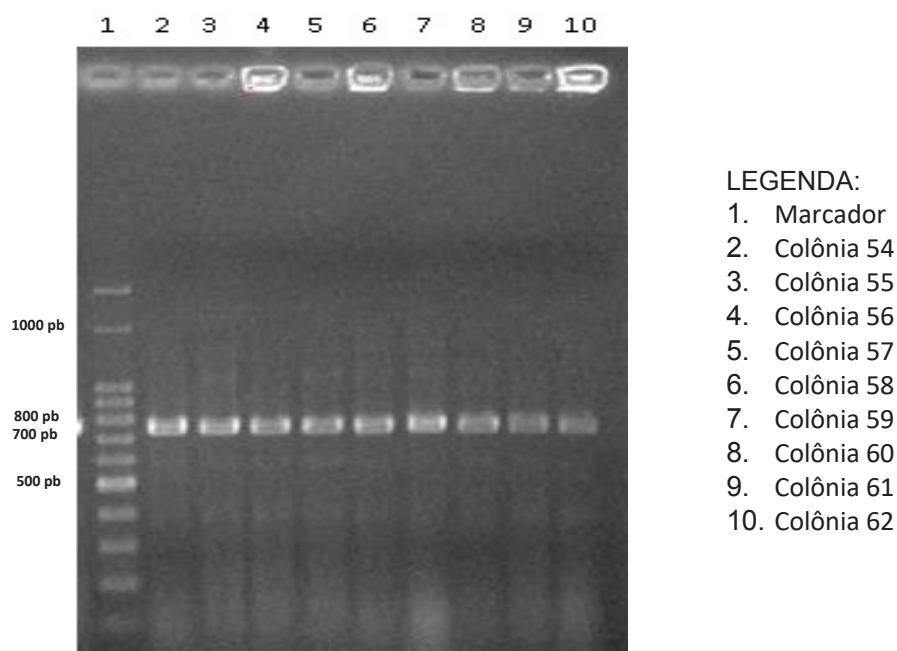
De acordo com os dados da tabela 5 e ilustração da figura 17, as colônias números 54, 55, 56, 57, 59 e 60 apresentaram tamanho do *amplicon* de aproximadamente 750 pb. As colônias denominadas 54 e 57 após serem submetidas à enzima de restrição *Hinfl*, exibiram três fragmentos de 340, 190 e 160 pb, e quando submetidas à enzima de restrição *Ddel*, verificou-se quatro fragmentos de 300, 180, 90 e 80 pb. Agustini et al. (2014) obtiveram padrão idêntico de fragmentação com a enzima *Hinfl*, para a levedura *Hanseniaspora uvarum*. Utilizando a enzima *Ddel* estes autores verificaram 300, 170, 90 e 80 pb. As colônias números 55, 56, 59 e 60 apresentaram perfil de fragmentação após a enzima *Ddel*, de 300, 170, 90 e 80 pb, condizentes com os estudos de Agustini et al. (2014) para a levedura *Hanseniaspora uvarum* o qual foi obtido padrão de fragmentação semelhante utilizando esta enzima.

A colônia número 58 apresentou tamanho de *amplicon* de 750 pb (tabela 5 e figura 17). Após ser submetida à enzima de restrição *Ddel* apresentou quatro fragmentos de 380, 170, 90 e 80 pb. Os pesquisadores Wang; Liu (2013) obtiveram resultados semelhantes aos do presente trabalho para *Hanseniaspora opuntiae*, utilizando a enzima de restrição *Ddel*: 380, 170, 90 e 90 pb.

As colônias números 61 e 62 (figura 17) e 63 a 70 apresentaram tamanho de *amplicon* de aproximadamente 850 pb (tabela 5). Após o uso das enzimas de restrição *HaeIII*, foram observados quatro fragmentos de 320, 240, 180 e 130 pb. Nas pesquisas de Pham et al. (2011) foram observados fragmentos de tamanhos semelhantes para *Saccharomyces cerevisiae* empregando a enzima *HaeIII*: 320, 240, 180 e 140 pb.



FIGURA 17 -PERFIL ELETROFORÉTICO DE PRODUTOS DE PCR EMPREGANDO OS INICIADORES ITS1 E ITS4 PARA AS LEVEDURAS ISOLADAS DO TEMPO 24 HORAS



FONTE: A autora (2019).

NOTA: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), em tampão TBE 1X. Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen). Gel corado com brometo de etídeo.

As leveduras *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora opuntiae* foram evidenciadas no tempo 24 horas de fermentação, e conforme já esperado também a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Segundo Aranda et al., (2011) e Fernández-Espinar et al. (2011) a levedura *Hanseniaspora uvarum* é comumente encontrada no mosto durante as primeiras horas após completar-se o tanque de fermentação. Conforme Manzanares et al. (2011), leveduras do gênero *Kloeckera/Hanseniaspora*, são usualmente encontradas nos estágios iniciais da fermentação alcoólica.

No término da fermentação alcoólica, após 139 horas, foi feita a descuba e coletada amostra. Nesta etapa do processo foram isoladas colônias números 71 a 74. Após a descuba e trasfega do vinho para o tanque de maturação, depois de 188 horas da adição do inóculo no mosto, foi coletada amostra de vinho do tanque de maturação. Foram isoladas colônias números 75 a 78. As colônias isoladas números 71 a 78 foram submetidas à técnica de PCR-RFLP. Os resultados e comparação com a literatura estão representados na tabela 6.

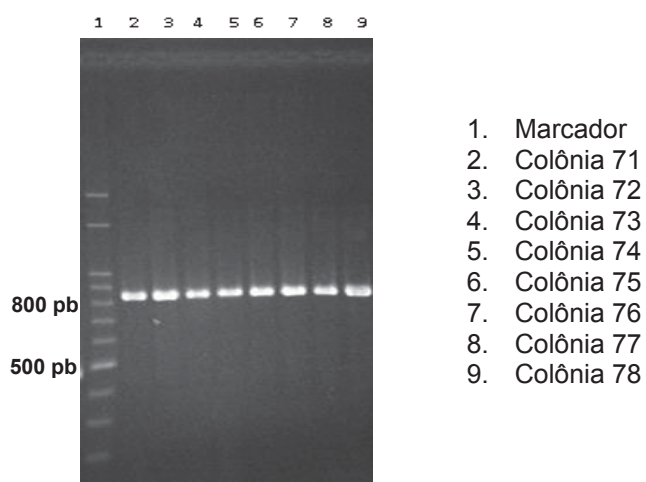
TABELA 6 - IDENTIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS ISOLADAS APÓS 139 HORAS E 188 HORAS DE FERMENTAÇÃO UTILIZANDO TAMANHO DOS *AMPLICONS* E DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO

Colônias Número de Referência	Espécies	Produto da PCR (pb)	Fragmentos de restrição			Referência
			<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	
71 a 74	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	850	--	320,240,180, 130	--	Presente estudo
75 a 78	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	850	--	320,240,180, 130	--	Presente estudo
--	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	370, 325, 140	310, 220, 170, 125	370, 360, 120	AGUSTINI et al., (2014)
--	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	340,320, 120	320,240,180, 140	390,390,100	PHAM et al. (2011)

FONTE: A autora (2019).

As colônias denominadas de 71 a 78 apresentaram tamanho de *amplicon* de aproximadamente 850 pb, demonstrado na figura 18. Após serem submetidas às enzimas de restrição *HaeIII*, foram verificados quatro fragmentos de 320, 240, 180 e 130 pb. Pham et al. (2011) obtiveram fragmentos de tamanhos semelhantes para *Saccharomyces cerevisiae* com a enzima *HaeIII*: 320, 240, 180 e 140 pb.

FIGURA 18 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE PRODUTOS DE PCR EMPREGANDO OS INICIADORES ITS1 E ITS4 PARA AS LEVEDURAS ISOLADAS DOS TEMPOS 139 E 188 HORAS DE FERMENTAÇÃO



FONTE: A autora (2019).

NOTA: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), em tampão TBE 1X. Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen). Gel corado com brometo de etídeo.

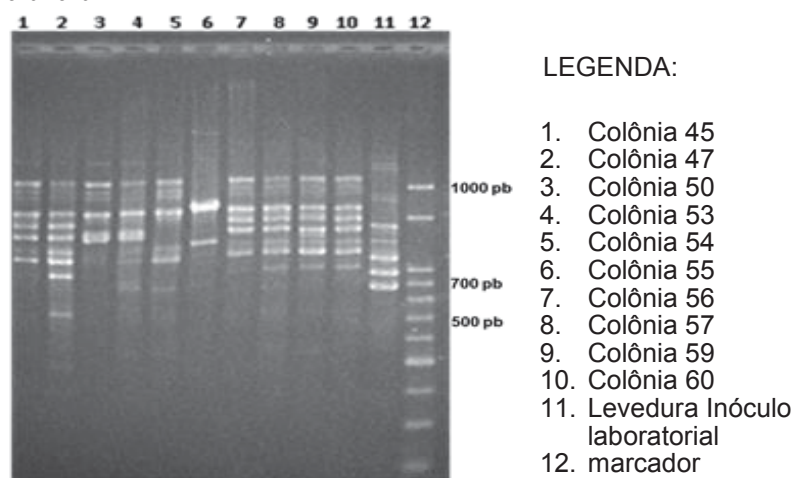
Nestes tempos de 139 e 188 horas, entre as leveduras isoladas, não foram identificadas leveduras *não-Saccharomyces*, somente a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* multiplica-se rapidamente e se sobrepõe aos outros micro-organismos presentes no mosto, passando a dominar o ambiente, por ser altamente tolerante a etanol, conforme apontam os relatos de Fernández-Espinar et al. (2011).

As colônias isoladas números 71 e 76 identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*, oriundas das amostras coletadas depois de 139 e 188 horas da adição do inóculo, possuem perfis de amplificação empregando PCR-RAPD semelhantes entre elas, porém, diferentes do perfil de amplificação da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* utilizada na vinícola. Estes resultados da análise de PCR-RAPD estão apresentados na figura 14, página 62, e mostram que as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (colônias 71 e 76) encontradas, que resistiram ao etanol, podem ser provenientes da microflora da uva dos mostos utilizados tanto no tanque do preparo do inóculo etapa industrial quanto do tanque de fermentação.

Ao longo do processo de vinificação, foram isoladas e identificadas leveduras *Hanseniaspora uvarum*. Visando confirmar se estas leveduras pertencem a mesma linhagem da levedura *Hanseniaspora uvarum* originária do inóculo etapa laboratorial, foi feita uma análise de PCR-RAPD utilizando o iniciador (GTG)<sub>5</sub> (figura 19).

FIGURA 19 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE PRODUTOS DE PCR-RAPD EMPREGANDO O INICIADOR (GTG)<sub>5</sub> PARA FINS DE COMPARAÇÃO DE LINHAGENS DE *Hanseniaspora uvarum*.



FONTE: A autora (2019).

NOTA: Eletroforese em gel de agarose a 1,8% (p/v), em tampão TBE 1X. Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen). Gel corado com brometo de etídeo.

Foram observados seis perfis diferentes de *Hanseniaspora uvarum*, contudo nenhuma destas leveduras apresentaram perfil idêntico ao da levedura autóctone isolada de uvas do estado do Paraná, *Hanseniaspora uvarum*, existente no inóculo etapa laboratorial. Provavelmente, todas as leveduras *Hanseniaspora uvarum* encontradas após a adição do inóculo etapa industrial, nos tempos zero e 24 horas, foram procedentes da microflora da uva utilizada no mosto do tanque de fermentação.

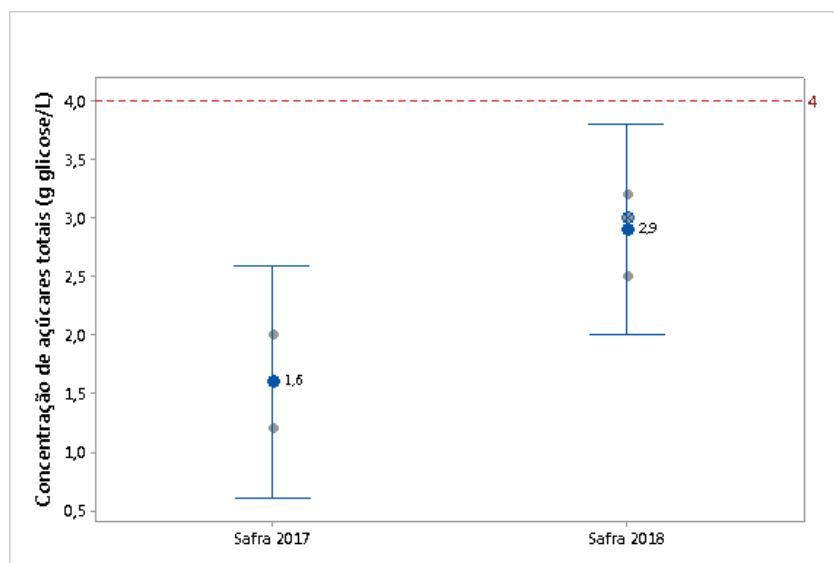
### 5.3 ANÁLISES DE PARÂMETROS ENOLÓGICOS

As análises são importantes tanto para acompanhar as principais transformações que acontecem no mosto, quanto para assegurar a qualidade do vinho que será comercializado, de acordo com Rizzon; Meneguzzo e Manfroï (2004).

No gráfico 1 estão representados os resultados obtidos dos vinhos para o teor de açúcares totais, em g.L<sup>-1</sup>. A linha vermelha indica o limite máximo de teor de açúcares totais, 4 g.L<sup>-1</sup>, para classificar um vinho como vinho de mesa seco, conforme o Decreto nº 8.198, de 20 de fevereiro de 2014, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (BRASIL, 2014). Este decreto regulamenta a Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho.

Foi verificado no vinho produzido em 2017, média de 1,6±0,40 g.L<sup>-1</sup> de teor de açúcares totais. No vinho elaborado em 2018 foi verificado média de 2,9±0,36 g.L<sup>-1</sup>. Portanto, os vinhos foram classificados como tinto de mesa secos.

GRÁFICO 1 - TEOR DE AÇÚCARES TOTAIS DOS VINHOS ELABORADOS EM 2017 E 2018



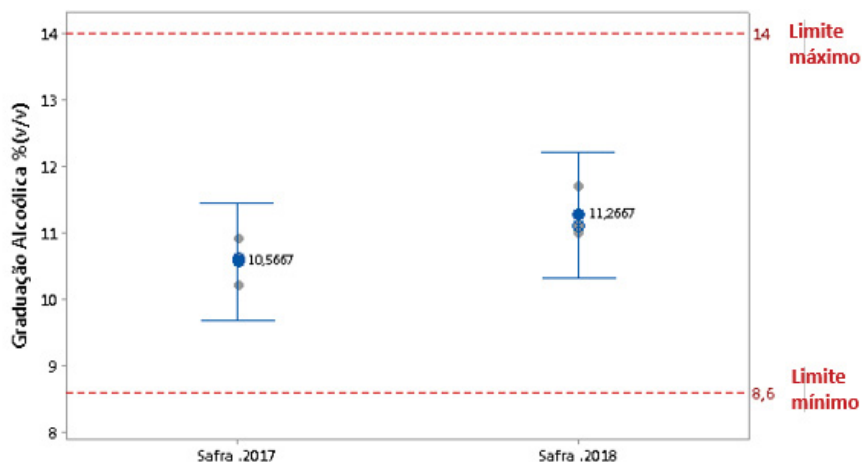
FONTE: A autora (2019).

NOTA: O gráfico demonstra os valores de teor de açúcares totais em g.L<sup>-1</sup> de glicose obtidos (círculos cinzas), médias (círculos azuis) e intervalo de confiança de 95% (barras verticais) para os vinhos de 2017 e 2018. A linha vermelha pontilhada representa o limite máximo de teor de glicose em g.L<sup>-1</sup> para vinho de mesa seco, conforme Decreto nº 8.198, de 20 de fevereiro de 2014, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (BRASIL, 2014).

De acordo com Decreto nº 8.198, de 20 de fevereiro de 2014 (BRASIL, 2014), “quanto ao teor de açúcares totais, expresso em gramas de glicose por litro, o vinho de mesa será classificado em seco - o que contiver até quatro gramas de glicose por litro; *demi-sec* ou meio-seco o que contiver superior a quatro e até vinte e cinco gramas de glicose por litro; ou suave ou doce o que contiver superior a vinte e cinco gramas de glicose por litro, sendo que para os vinhos de *Vitis vinifera* o limite máximo é de oitenta gramas de glicose por litro”.

Os valores determinados para a graduação alcoólica dos vinhos estão representados no gráfico 2, juntamente com a indicação da variação permitida para vinhos de mesa, de acordo com a Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho e Derivados da Uva e do Vinho, Instrução Normativa nº 14 de 08 de fevereiro de 2018, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2018), que é entre 8,6 a 14 % v/v de graduação alcoólica a 20 °C.

GRÁFICO 2 - GRADUAÇÃO ALCÓOLICA DOS VINHOS ELABORADOS EM 2017 E 2018



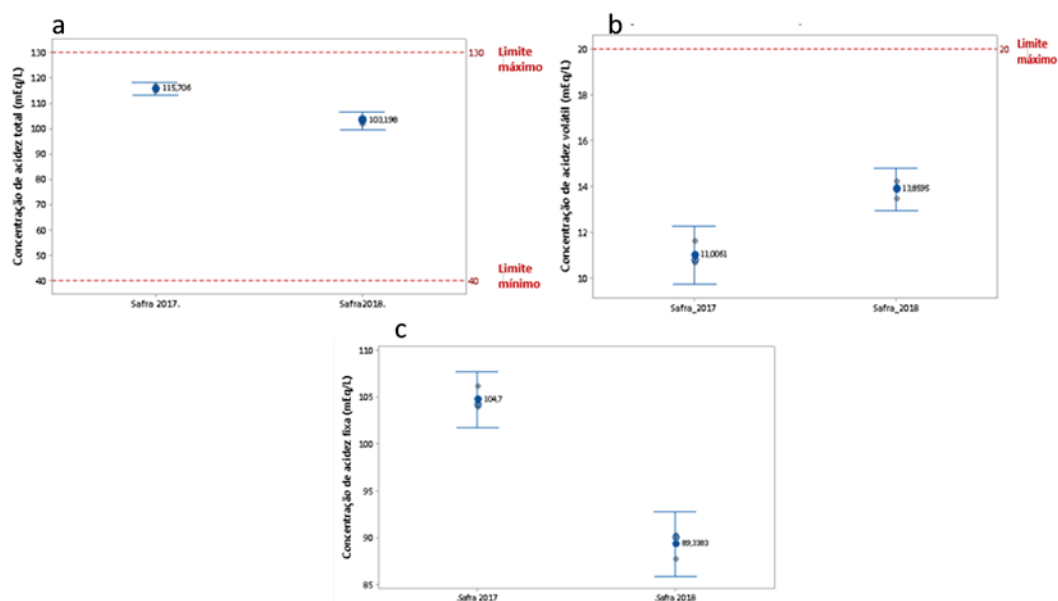
FONTE: A autora (2019).

NOTA: O gráfico demonstra os valores de graduação alcoólica obtidos (círculos cinzas), médias (círculos azuis) e intervalo de confiança de 95% (barras verticais) para os vinhos de 2017 e 2018. As linhas vermelhas pontilhadas representam o limite mínimo e máximo de graduação alcoólica em porcentagem v/v a 20 °C para vinho de mesa, conforme Instrução Normativa nº 14 de 08 de fevereiro de 2018, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (BRASIL, 2018).

O vinho produzido em 2017 alcançou uma graduação alcoólica média de  $10,57 \pm 0,35\%$  v/v a 20 °C e o vinho elaborado em 2018 atingiu a graduação alcoólica média de  $11,27 \pm 0,38\%$  v/v a 20 °C. Os resultados dos vinhos estão de acordo com a legislação vigente.

No gráfico 3a está demonstrada a variação permitida pela legislação para acidez total em vinhos de mesa, de 40 a 130 mEq.L<sup>-1</sup> e os valores para os vinhos elaborados em 2017 e 2018. Foi determinado o valor médio de  $115,706 \pm 1,040$  mEq.L<sup>-1</sup> de acidez total para o vinho de 2017 e  $103,198 \pm 1,379$  mEq.L<sup>-1</sup> para o vinho de 2018.

GRÁFICO 3 - CONCENTRAÇÃO DE ACIDEZ TOTAL (a), VOLÁTIL (b) E FIXA (c) DOS VINHOS ELABORADOS EM 2017 E 2018



FONTE: A autora (2019).

NOTA: Os gráficos demonstram os valores de acidez total (a), volátil (b) e fixa (c) obtidos (círculos cinzas), médias (círculos azuis) e intervalo de confiança de 95% (barras verticais) para os vinhos de 2017 e 2018. As linhas vermelhas pontilhadas representam o limite mínimo e máximo de acidez total em mEq.L<sup>-1</sup> para vinho de mesa (a) e limite máximo de acidez volátil em mEq.L<sup>-1</sup> para vinho de mesa (b), conforme Instrução Normativa nº 14 de 08 de fevereiro de 2018, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (BRASIL, 2018).

No gráfico 3b estão representados os valores de acidez volátil para os vinhos produzidos em 2017 e 2018, de 11,00±0,51 mEq.L<sup>-1</sup> e 13,86±0,37 mEq.L<sup>-1</sup> respectivamente. A linha vermelha representa o valor máximo permitido pela legislação, que é de 20 mEq.L<sup>-1</sup>. Os resultados de acidez total e volátil dos vinhos estão em conformidade com o estabelecido pela legislação vigente (BRASIL, 2018) para vinhos de mesa.

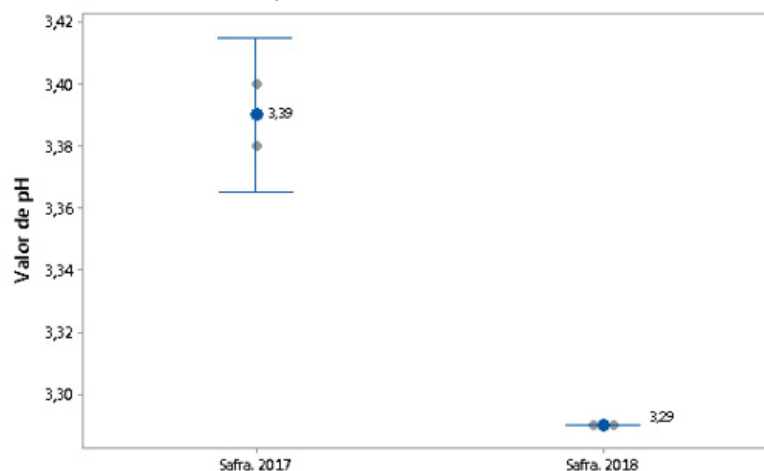
A acidez fixa é obtida pelo cálculo da diferença entre acidez total e acidez volátil. No gráfico 3c estão mostrados os resultados de acidez fixa para os vinhos de 2017 e 2018. Foi verificado no vinho de 2017, valor médio de 104,7±1,2 mEq.L<sup>-1</sup> e no vinho de 2018, 89,33±1,40 mEq.L<sup>-1</sup>. Não há limites máximos e mínimos instituídos para acidez fixa na legislação vigente (BRASIL, 2018).

Segundo Rizzon; Miele (2002) a acidez dos vinhos tem influência nas suas características sensoriais, na cor e na estabilidade físico-química e biológica. A

acidez total é representada pelos ácidos provenientes tanto da uva, quanto da fermentação. A acidez volátil está relacionada à presença dos ácidos acético, fórmico, butírico e láctico. O ácido acético é o principal ácido volátil do vinho. Sua presença em altas concentrações emite um odor acético, por isso a acidez volátil é um dos parâmetros analíticos mais importantes na enologia. A acidez fixa é representada principalmente pelos ácidos málico, tartárico e cítrico, presentes na uva, succínico, oriundo da fermentação e ácidos inorgânicos. O pH quantifica a concentração de hidrogênio iônico do vinho e depende do tipo e da concentração dos ácidos orgânicos e da concentração de cátions, principalmente do potássio.

O valor de pH baixo previne o aparecimento de micro-organismos que deterioram os vinhos, conforme Aranda et al. (2011). No gráfico 4 estão representados os valores de pH para os vinhos de 2017 e 2018. O valor médio de pH para o vinho elaborado em 2017 foi de  $3,39 \pm 0,01$  e para o vinho de 2018 de 3,29. A legislação vigente (BRASIL, 2018) não estabelece limites máximos e mínimos para o valor de pH nos vinhos.

GRÁFICO 4 - VALORES DE pH DOS VINHOS ELABORADOS EM 2017 E 2018



FONTE: A autora (2019).

NOTA: O gráfico demonstra os valores de pH obtidos (círculos cinzas), médias (círculos azuis) e intervalo de confiança de 95% (barras verticais) para os vinhos de 2017 e 2018.

No que tange à análise de sulfatos nos vinhos, os resultados são expressos em gramas de sulfato de potássio por litro. São provenientes das uvas e da oxidação do dióxido de enxofre. A determinação de sulfato é útil para comprovar casos de adulteração de vinhos com baixo conteúdo ácido, nos quais foi adicionado ácido sulfúrico, segundo Dorneles (2003).



O valor obtido para sulfatos, tanto para o vinho produzido em 2017 quanto para o vinho produzido em 2018 foi de menos de  $0,7 \text{ g.L}^{-1}$  em sulfato de potássio, e os valores conseguidos estão em conformidade com a legislação (BRASIL, 2018), que deve ser até  $1,2 \text{ g.L}^{-1}$ .

Apesar de a legislação vigente (BRASIL, 2018) não requisitar a quantificação de dióxido de enxofre, este parâmetro foi avaliado. Esta quantificação é importante, pois, pelo fato do *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos determinar que o mesmo poderia causar problemas de saúde para alguns indivíduos asmáticos, foi imposto um limite pela Organização Internacional do Vinho (OIV)<sup>2</sup> de no máximo  $350 \text{ mg.L}^{-1}$ . (ZOECKLEIN et al., 2001).

Os valores médios e desvios padrões obtidos para dióxido de enxofre livre foram  $52,7 \pm 1 \text{ mg.L}^{-1}$  para o vinho de 2017 e  $53,8 \pm 3 \text{ mg.L}^{-1}$  para o vinho de 2018.

Segundo Dorneles (2003), o extrato seco total são os sólidos solúveis que permanecem após a eliminação do álcool de um vinho. Inclui açúcares totais, ácidos fixos, glicerina, 2,3-butilenoglicol e fenóis. O extrato seco reduzido é o valor obtido pela diferença entre o extrato seco total e os teores de açúcares totais e sulfatos, quando maiores que  $1 \text{ g.L}^{-1}$ .

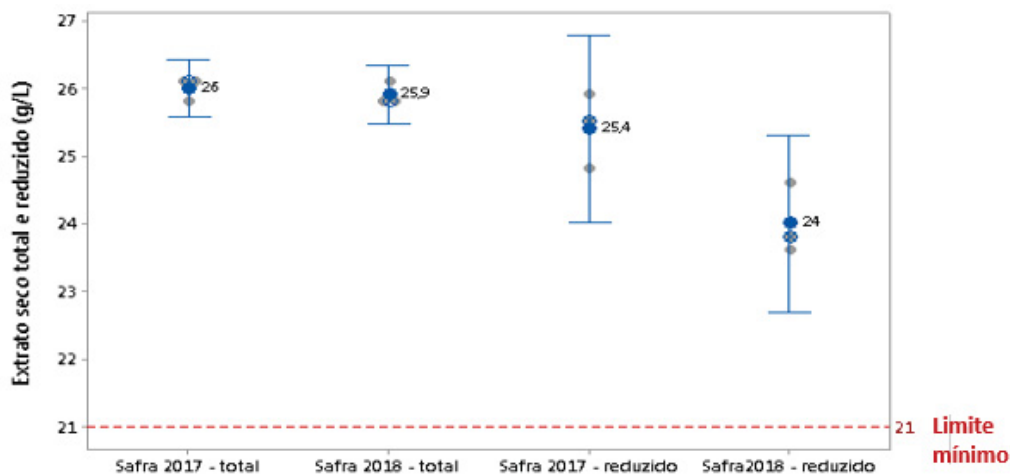
No gráfico 5 estão apresentados os resultados de extrato seco total e extrato seco reduzido para os vinhos elaborados em 2017 e 2018. Para o vinho de 2017 observa-se o valor médio de  $26 \pm 0,173 \text{ g.L}^{-1}$  de extrato seco total e para o vinho de 2018 de  $25,9 \pm 0,170 \text{ g.L}^{-1}$ . Foram verificados valores médios de extrato seco reduzido de  $25,4 \pm 0,55 \text{ g.L}^{-1}$  para o vinho de 2017 e  $24 \pm 0,53 \text{ g.L}^{-1}$  para o vinho de 2018. A linha vermelha representa o valor mínimo de  $21 \text{ g.L}^{-1}$  de extrato seco reduzido, que é estabelecido pela legislação vigente (BRASIL, 2018). Os vinhos estão em conformidade com a legislação para este parâmetro.

O extrato seco total é uma propriedade físico-química que está vinculada à estrutura do vinho, ou seja, ao corpo. Quanto maior o teor de extrato seco total, maior será a sensação de textura proporcionada pelo vinho. O valor de extrato seco total indica, em relação ao vinho seco, que não foi submetido a adulterações tais como diluição com água, segundo Bird (2005).

---

<sup>2</sup> A OIV é uma organização intergovernamental de natureza científica e técnica de competência reconhecida para as suas obras relativas a vinhas, vinho, bebidas à base de vinho, uvas de mesa, passas e outros produtos à base de plantas.

GRÁFICO 5 - CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO SECO TOTAL E REDUZIDO DOS VINHOS ELABORADOS EM 2017 E 2018



FONTE: A autora (2019).

NOTA: O gráfico demonstra os valores de extrato seco total e reduzido obtidos (círculos cinzas), médias (círculos azuis) e intervalo de confiança de 95% (barras verticais) para os vinhos de 2017 e 2018. A linha vermelha pontilhada representa o limite mínimo em  $\text{g.L}^{-1}$  de extrato seco reduzido para vinho de mesa, conforme Instrução Normativa nº 14 de 08 de fevereiro de 2018, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (BRASIL, 2018).

#### 5.4 ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

São inúmeros os fatores que parecem ter influência na formação de álcoois superiores durante a fermentação, tais como as espécies e linhagens de levedura, pH, composição do mosto de uva e temperatura de fermentação, conforme Liu et al. (2017).

No presente estudo, a soma das concentrações dos álcoois superiores analisados foi de  $159,55 \text{ mg.L}^{-1}$  para o vinho de mesa de 2017 e  $239,97 \text{ mg.L}^{-1}$  para o vinho de mesa de 2018, conforme apresentado na tabela 7. Estas concentrações encontram-se dentro dos limites gerais esperados, de 140 a  $510 \text{ mg.L}^{-1}$ , para vinhos finos brasileiros, segundo dados de acompanhamento de safras da Embrapa Uva e Vinho. No entanto, a concentração de 3-metil,1-butanol para o vinho 2017 ficou abaixo dos limites gerais esperados para vinhos finos brasileiros. Não há limites mínimos e máximos estabelecidos para compostos voláteis na legislação brasileira.

TABELA 7 - RESULTADOS DE ÁLCOOIS SUPERIORES DOS VINHOS ELABORADOS EM 2017 E 2018

Parâmetros (mg.L <sup>-1</sup> )	Vinho 2017	Vinho 2018	Limite mínimo	Limite máximo
<b>1-Propanol</b>	<b>35,09±0,342</b> CV 8,22%	<b>45,80±0,057</b> CV 1,03%	1	50
<b>2-metil, 1-Propanol (isobutanol)</b>	<b>39,02±0,0110</b> CV 2,08%	<b>64,34±0,0074</b> CV 0,87%	20	110
<b>3-Metil, 1-Butanol (álcool isoamílico)</b>	<b>85,44±0,0178</b> CV 5,66%	<b>129,83±0,0122</b> CV 2,3%	120	350
<b>Soma dos Álcoois Superiores</b>	<b>159,55</b>	<b>239,97</b>	140	510

FONTE: A autora (2019).

NOTA: CV = Coeficiente de variação. Limites mínimos e máximos de acordo com limites gerais esperados para vinhos finos brasileiros, segundo dados de acompanhamento de safras da Embrapa Uva e Vinho.

A soma das concentrações dos álcoois superiores, para os vinhos de mesa produzidos em 2017 e 2018 está de acordo com os valores usualmente descritos para vinhos finos, de 150 a 550 mg.L<sup>-1</sup>, conforme aponta o estudo de Moreira et al. (2011). Os autores descrevem ainda, que concentrações altas de álcoois superiores podem acarretar ao vinho sabor e cheiro forte e picante, ao passo que em concentrações moderadas, contribuem para a complexidade aromática.

Como pode ser observado na tabela 7, foram determinadas as concentrações de 35,09±0,342 mg.L<sup>-1</sup> e 45,80±0,057 mg.L<sup>-1</sup> para 1-propanol e 85,44±0,0178 mg.L<sup>-1</sup> e 129,83±0,0122 mg.L<sup>-1</sup> para o álcool isoamílico nos vinhos de mesa de 2017 e 2018, respectivamente, valores próximos aos relatados por Martínez-Pinilla et al. (2013) para 1-propanol e inferiores para álcool isoamílico. Estes pesquisadores elaboraram vinhos, 500 L, utilizando mosto de uvas *Vitis vinifera*, inoculados com levedura comercial seca ativa *Saccharomyces cerevisiae* (Uvaferm VRB, Lallemand Inc., Spain), na concentração de 25 g.hL<sup>-1</sup>. Os autores verificaram entre os compostos voláteis, 1-propanol nas concentrações de 32,8±1,2 mg.L<sup>-1</sup>; 22,77±0,5 mg.L<sup>-1</sup> e 21,97±0,62 mg.L<sup>-1</sup> e álcool isoamílico nas concentrações de 201,57±3,71 mg.L<sup>-1</sup>; 261,8±5,1 mg.L<sup>-1</sup> e 290,6±7,0 mg.L<sup>-1</sup> para as cultivares Tempranillo, Monastel e Maturana Tinta de Navarrete, respectivamente.

Em relação aos resultados de isobutanol para o vinho de mesa de 2017 foi quantificado 39,02±0,0110 mg.L<sup>-1</sup> e 64,34±0,0074 mg.L<sup>-1</sup> para o vinho de mesa de 2018. Vinhos em escala laboratorial, 20 L, foram produzidos por Vigentini et al.

(2016), com cultivar *Vitis vinifera*, utilizando leveduras não-*Saccharomyces kluyveromyces marxianus* (UMY207), *Torulaspora delbrueckii* (UMY196), e *Saccharomyces cerevisiae* (UMY255) e encontraram 38 mg.L<sup>-1</sup>, 27 mg.L<sup>-1</sup>, 38 mg.L<sup>-1</sup> de isobutanol, respectivamente.

O resultado obtido para o isobutanol no vinho de mesa produzido em 2018, utilizando as leveduras não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces cerevisiae* conforme tabelas 3 a 6, páginas 60 a 72, foi superior aos valores conseguidos por Vigentini et al. (2016), produzidos tanto com inóculos simples de *Kluyveromyces marxianus* e de *Torulaspora delbrueckii* quanto com monocultura de *Saccharomyces cerevisiae*.

Varela et al. (2017) em experimentos de vinificação (1 L) com uvas da cultivar Merlot, quando utilizaram inoculação simultânea de *Metschnikowia pulcherrima* (AWRI3050) e *Saccharomyces cerevisiae* (AWRI838), obtiveram a concentração de 48,10±0,65 mg.L<sup>-1</sup> de isobutanol. No momento em que empregaram nos experimentos como inóculos monocultura de *Saccharomyces cerevisiae*, verificaram concentração de 31,28±1,91 mg.L<sup>-1</sup> e monocultura de *Saccharomyces uvarum* (AWRI2846) de 68,35±0,66 mg.L<sup>-1</sup>. No experimento de fermentação espontânea constataram 62,79±8,65 mg.L<sup>-1</sup> de isobutanol.

Os autores Lombardi et al. (2018) encontraram a maior concentração de isobutanol (60,2±6,2 mg.L<sup>-1</sup>) em vinhos produzidos em escala industrial de 900 L, utilizando inóculo misto de *Hanseniaspora guilliermondii* autóctone e *Saccharomyces cerevisiae* comercial em relação aos outros dois vinhos, um produzido somente com *Saccharomyces cerevisiae* comercial, e o outro sem adição de leveduras (fermentação espontânea). Todavia, o álcool superior isoamílico, só foi detectado no vinho produzido com levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial, e na concentração de 69,1±3,6 mg.L<sup>-1</sup>.

No trabalho de Tristezza et al. (2016), os autores verificaram nos vinhos produzidos em escala piloto de 90 L de mosto de uvas *Vitis vinifera*, com inóculo misto de *Hanseniaspora uvarum* (ITEM8795) e *Saccharomyces cerevisiae* (ITEM6920) concentrações de 0,312±0,033 mg.L<sup>-1</sup> de 1-propanol e 0,966±0,566 mg.L<sup>-1</sup> de isobutanol, valores inferiores aos obtidos nos vinhos de 2017 e 2018.

De acordo com o trabalho de Liu et al. (2017) a cultivar da uva tem maior influência na produção de álcoois superiores do que as espécies de leveduras. Os álcoois de seis carbonos podem ser considerados características de cultivares de

uva, pois são o produto da degradação de ésteres do ácido linoléico e linolênico, presentes nas partes sólidas da baga, pelas enzimas da uva. No tocante ao efeito da ação das leveduras, as fermentações sequenciais inoculadas com *Metschnikowia viticola* (SF2-17 não publicada) e *Saccharomyces cerevisiae* comercial (Saint Georges S101, BioSpringer, França) produziram um aumento substancial de 1-propanol e 1-butanol, enquanto com *Metschnikowia fructicola* (RU9-4) e *Saccharomyces cerevisiae* produziu isobutanol aumentado. Contrariamente, estes três álcoois superiores exibiram os níveis mais baixos nos vinhos elaborados com *Hansaniaspora uvarum* (RT9-7) e *Saccharomyces cerevisiae*.

O vinho de mesa elaborado em 2017 apresentou 102,76 mg.L<sup>-1</sup> de acetato de etila e 28,33 mg.L<sup>-1</sup> de aldeído acético e no vinho de mesa de 2018 foi verificado 20,6 mg.L<sup>-1</sup> de aldeído acético e 97,81 mg.L<sup>-1</sup> de acetato de etila. As concentrações de aldeído acético e acetato de etila encontram-se dentro dos limites gerais esperados para vinhos finos brasileiros, segundo dados de acompanhamento de safras da Embrapa Uva e Vinho, conforme demonstrado na tabela 8.

TABELA 8 - RESULTADOS DE ALDEÍDO ACÉTICO E ACETATO DE ETILA DOS VINHOS ELABORADOS EM 2017 E 2018

Parâmetros (mg.L <sup>-1</sup> )	Vinho 2017	Vinho 2018	Limite mínimo	Limite máximo
<b>Aldeído Acético</b>	<b>28,33± 0,0041</b> CV 2,66%	<b>20,06± 0,0011</b> CV 0,98%	Traços	60
<b>Acetato de Etila</b>	<b>102,76± 0,0036</b> CV 0,51%	<b>97,81± 0,0019</b> CV 0,29%	40	120

FONTE: A autora (2019).

NOTA: CV = Coeficiente de variação. Limites mínimos e máximos de acordo com limites gerais esperados para vinhos finos brasileiros, segundo dados de acompanhamento de safras da Embrapa Uva e Vinho.

O aldeído acético contribui para o aroma frutado, porém altos níveis (acima de 200 mg.L<sup>-1</sup>), prejudicam o aroma nos vinhos. Igualmente, tem sido demonstrado que o acetato de etila confere aroma frutado de abacaxi, balsâmico e verniz, se em concentrações abaixo de 150 mg.L<sup>-1</sup>. (TRISTEZZA et al., 2016; MOREIRA et al., 2011; WU et al., 2017). Vinhos com concentração de acetato de etila superior a 150 mg.L<sup>-1</sup> podem apresentar odor acético. O impacto negativo do acetato de etila pode ser minimizado durante o envelhecimento do vinho na garrafa. (MOREIRA et al., 2011).

Em um estudo que descreve o perfil aromático de diferentes espécies de leveduras, citado por Manzanares et al. (2011) foi relatado pouca variação na produção de acetaldeído por 52 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, média de 50 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto houve diferenças entre as 59 linhagens de *Hanseniaspora uvarum*, média de 25 mg.L<sup>-1</sup>. O valor médio de concentração de aldeído acético para as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* é superior e para as linhagens de *Hanseniaspora uvarum* avaliadas é semelhante aos resultados conseguidos para os vinhos elaborados em 2017 e 2018, apresentados na tabela 8.

Tristezza et al. (2012) utilizaram linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* autóctones como iniciadoras das fermentações e produziram vinhos em escala industrial, com 15 toneladas de uvas *Vitis vinifera*, cultivar Negroamaro. As concentrações de aldeído acético nestes vinhos variaram de 1,87±0,2 mg.L<sup>-1</sup> (linhagem 6993) a 10,44±0,2 mg.L<sup>-1</sup> (linhagem 6920). O acetato de etila foi detectado em quantidades na faixa de 47,61±2,2 mg.L<sup>-1</sup> (linhagem 6993) e 54,92±2,2 mg.L<sup>-1</sup> (linhagem 6920). No vinho tinto de mesa seco produzido em 2018, em que durante a produção foram isoladas e identificadas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (tabelas 3 a 6, páginas 60 a 72), foram verificadas concentrações de aldeído acético e acetato de etila (tabela 8, página 83) superiores aos valores apresentados por estes autores.

Os autores Liu et al. (2017) fizeram em escala laboratorial (frascos de 2 L), fermentações empregando sucos de uvas tintas pasteurizados das cultivares *Vitis vinifera* Bolero, Rondo e Regent, os quais foram inoculados com uma levedura *Metschnikowia fructicola* (RU9-4), *Metschnikowia fructicola* (SF2-17) e *Hanseniaspora uvarum* (RT9-7) seguida de *Saccharomyces cerevisiae* comercial (Saint Georges S101, Bio Springer, France) após 3 dias e somente com *Saccharomyces cerevisiae* comercial. Dentro de cada cultivar de uva, o acetato de etila apresentou maiores valores nos vinhos fermentados sequencialmente com *Hanseniaspora uvarum* (RT9-7) e *Saccharomyces cerevisiae* comercial (Saint Georges S101, Bio Springer, France) do que no resto dos vinhos. Os autores observaram ainda, que a levedura *Hanseniaspora uvarum* é uma forte produtora de acetatos e glicerol, mas também produz altos níveis de acetato de etila e ácido acético, os quais classificaram como compostos indesejáveis, se em altos níveis. Manzanares et al. (2011) também descreveram a levedura *Hanseniaspora uvarum* como forte produtora de ésteres em geral.

Alguns fatores podem influenciar na concentração de ésteres de etila no vinho, tais como concentração de açúcar do meio, aeração, temperatura e tipo de levedura utilizada na fermentação, manutenção do nível adequado de dióxido de enxofre e controle do crescimento bacteriano, conforme Moreira et al. (2011) e Tristezza et al. (2016).

Leveduras *Hanseniaspora* spp. em fermentações mistas com *Saccharomyces cerevisiae* foram retratadas por aumentar a formação de ésteres com um impacto positivo no sensorial, bem como, diminuir a produção de acidez volátil, segundo Tristezza et al. (2016). Estes mesmos autores fizeram experimentos em escala industrial, utilizando sete toneladas de mosto de uva Negroamaro *Vitis vinifera* com inoculação simultânea das leveduras autóctones *Hanseniaspora uvarum* (ITEM8795) e *Saccharomyces cerevisiae* (ITEM6920), isoladas de uvas Negroamaro e obtiveram concentrações de 87,04 mg.L<sup>-1</sup> de acetato de etila e 24,11 mg.L<sup>-1</sup> de aldeído acético. Estes resultados são condizentes com as concentrações de aldeído acético e acetato de etila (tabela 8, página 83) obtidas no presente estudo para o vinho elaborado em 2018, em que ao longo do processo, foram isoladas e identificadas linhagens de *Hanseniaspora uvarum* (figura 19, página 73) e *Saccharomyces cerevisiae* (tabelas 3 a 6, páginas 60 a 72).

## 5.5 ANÁLISE DE RESVERATROL

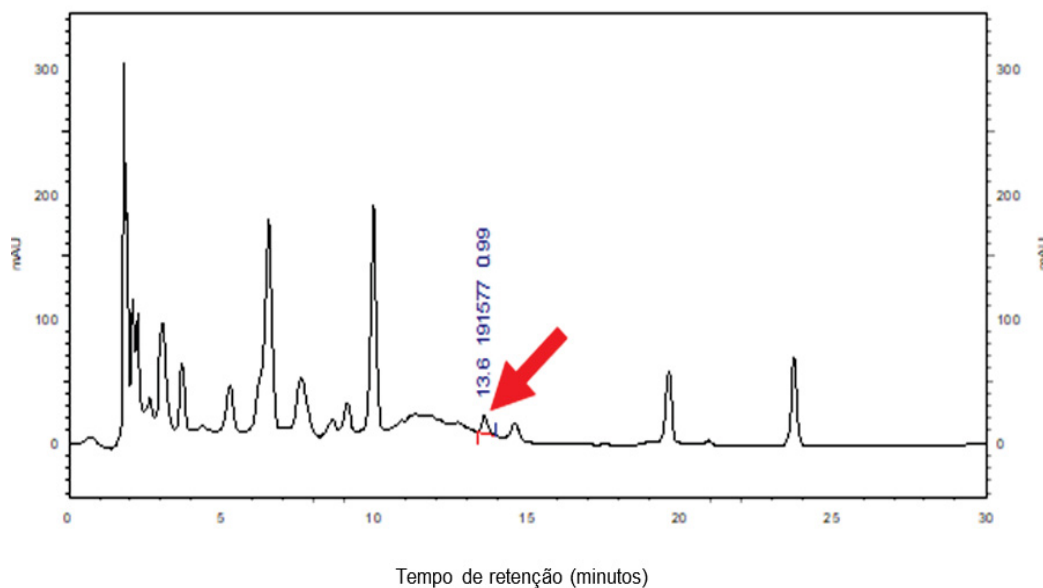
A quantificação do resveratrol foi efetuada por meio de curva de calibração ( $R^2 = 0,9858$ ) com o padrão nas concentrações de 1 a 40 mg.L<sup>-1</sup>, e o tempo de retenção observado foi de 13,6 minutos em média.

Os resultados de concentração de resveratrol obtidos para os vinhos de mesa produzidos foram de 3,4187±0,0489 mg.L<sup>-1</sup> para o vinho de mesa de 2017 e de 3,5842±0,1155 mg.L<sup>-1</sup> para o vinho de 2018. Não há limites mínimos e máximos estabelecidos para vinhos na legislação brasileira para resveratrol.

Na figura 20 está representado o cromatograma de análise de resveratrol, para o vinho de mesa produzido em 2018. A seta indica o pico do resveratrol, que aparece no tempo de retenção de 13,6 minutos.



FIGURA 20 - CROMATOGRAMA DE ANÁLISE DE RESVERATROL DO VINHO ELABORADO EM 2018



FONTE: A autora (2019).

É um desafio prever a quantidade de resveratrol presente em um vinho, pois são muitos os fatores que afetam tanto a sua biossíntese nas uvas bem como sua transferência para o vinho, citado por Gaensly et al. (2015).

De Castilhos et al. (2015) efetuaram experimentos de fermentação, em frascos de 10 L, utilizando uvas *Vitis labrusca*, das cultivares Bordô e Carmen, do estado de São Paulo, e como inóculo a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* seca ativa Y904 (Amazon Group®). O resultado nos vinhos de mesa tintos de *cis*-resveratrol das fermentações foi de  $0,28 \pm 0,31 \text{ mg.L}^{-1}$  quando foi empregada a cultivar Bordô, e de  $0,2 \pm 0,06 \text{ mg.L}^{-1}$  com a cultivar Carmen. Estes valores são inferiores aos obtidos para *trans*-resveratrol nos vinhos de mesa produzidos com a cultivar Bordô, em escala industrial no presente estudo, em 2017 e 2018. Sabe-se que segundo Mattivi et al. (1995) a forma *cis* do resveratrol é predominantemente encontrada no início da fermentação do mosto, ao passo que no final o isômero *trans* ocorre em maior concentração.

Ballus et al. (2012) determinaram a concentração *trans*-resveratrol em vinte e três vinhos produzidos em diferentes regiões do Brasil, adquiridos em supermercados. No vinho de uva *Vitis vinifera*, cultivar Merlot foi quantificada a concentração de *trans*-resveratrol de  $6,86 \pm 0,21 \text{ mg.L}^{-1}$ , e no vinho fino de uva da cultivar Cabernet Sauvignon de  $4,26 \pm 0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ . Em contrapartida, as concentrações



de *trans*-resveratrol nos vinhos das cultivares Syrah, Bordô e Máximo foram de  $0,95 \pm 0,08 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $0,77 \pm 0,03 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $1,0 \pm 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente. O resultado de concentração mostrado para o vinho de uva *Vitis labrusca*, cultivar Bordô foi diferente do conseguido no presente estudo para os vinhos de 2017 e 2018, igualmente elaborados com uva *Vitis labrusca*, cultivar Bordô.

Gallice et al. (2011) analisaram resveratrol em 47 vinhos tintos cedidos por vinícolas do Sul do Brasil ou adquiridos em supermercados e determinaram intervalo de concentração entre  $0,14$  e  $5,75 \text{ mg.L}^{-1}$ , com valor médio da ordem de  $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$ . Entre os vinhos analisados, somente quatro, elaborados com uvas *Vitis vinifera* cultivares Merlot, Tannat e Carmenere, apresentaram valores de concentração de resveratrol de  $4,4 \text{ mg.L}^{-1}$  a  $5,4 \text{ mg.L}^{-1}$ , acima dos obtidos para os vinhos de mesa de 2017 e 2018 ( $3,417 \pm 0,0472 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $3,586 \pm 0,1132 \text{ mg.L}^{-1}$ ). No entanto, nos vinhos de mesa analisados elaborados com a mistura de uvas *Vitis labrusca*, cultivares Isabel e Bordô, a concentração de resveratrol foi de  $1,7 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0,7 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente.

As diferenças observadas entre vinhos de diferentes procedências podem ser devidas a um conjunto de características conhecido como *terroir*, que reúne aspectos relacionados com o solo e o clima, dentre outras características locais conforme a descrição de Gallice et.al. (2011).

## 6 CONCLUSÃO

A ampliação de escala se constituiu em um dos grandes desafios deste estudo. Ao se ampliar a escala de produção, obteve-se resultados diferentes dos obtidos em escala laboratorial. Isto se deve ao fato de as condições ambientais não terem sido mantidas constantes, afetando, conseqüentemente, o comportamento da levedura do inóculo da etapa laboratorial.

Os resultados deste trabalho demonstraram que o inóculo da etapa laboratorial foi confirmado como *Hanseniaspora uvarum*, porém, na etapa industrial, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* residente, se sobrepôs à levedura *Hanseniaspora uvarum* selecionada. *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura comumente utilizada na elaboração dos vinhos, por ser muito resistente a etanol, sobreviveu até o fim do processo, comprovado pelas amostragens e análises.

Os vinhos de mesa elaborados em 2017 e 2018 estão de acordo com a legislação brasileira vigente, para os parâmetros analisados.

## REFERÊNCIAS

AGILENT TECHNOLOGIES, Inc. **Alcohols**. Fast analysis of alcohols in alcoholic beverages. Application Note. 2015. Disponível em: < [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)>. Acesso em: 09 fev. 2019.

AGUSTINI, B. C.; SILVA, L. P.; BLOCH, C.; BONFIM, T. M. B.; DA SILVA, G. A. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5645–5654, 2014.

ALBERTIN, W.; SETATI, M. E.; MIOT-SERTIER, C.; et al. *Hanseniaspora uvarum* from winemaking environments show spatial and temporal genetic clustering. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JAN, 2016.

AMORIM, D. A. DE; REGINA, M. DE A.; FÁVERO, A. C.; MOTA, R. V.; PEREIRA, G. E. Vinhos finos: rumo à qualidade. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 234, p. 65–76, 2006.

ANTONIOLLI, A.; FONTANA, A. R.; PICCOLI, P.; BOTTINI, R. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. **Food Chemistry**, v. 178, p. 172–178, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.082>>. .

ARANDA, A.; MATAALLANA, E.; MARCEL LI´ DEL OLMO. *Saccharomyces* Yeasts I: Primary Fermentation. **Molecular Wine Microbiology**. Espanha: Elsevier, 2011. p.1–31.

BAFFI, M. A.; DOS SANTOS BEZERRA, C.; ARÉVALO-VILLENA, M.; et al. Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 75–78, 2011.

BALLUS, Cristiano Augusto et al. Optimization of capillary zone electrophoresis separation and on-line preconcentration of 16 phenolic compounds from wines produced in South America. **Food Research International**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.136-144, jan. 2012.

BARNETT, J. A.; ENTIAN, K.-D. A history of research on yeasts 9 : regulation of sugar metabolism. **Yeast**, v. 22, p. 835–894, 2005.

BELDA, I.; RUIZ, J.; ESTEBAN-FERNÁNDEZ, A.; et al. Microbial contribution to Wine aroma and its intended use for Wine quality improvement. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 1–29, 2017.

BIASOTO, A. C. T.; NETTO, F. M.; MARQUES, E. J. N.; DA SILVA, M. A. A. P. Acceptability and preference drivers of red wines produced from *Vitis labrusca* and hybrid grapes. **Food Research International**, v. 62, p. 456–466, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.052>>. .

BIRD, D. **Understanding Wine Technology: The Science of Wine Explained**. Grã-

Bretanha: DBQA, 2005.

BLANCO, P.; ORRIOLS, I.; LOSADA, A. Survival of commercial yeasts in the winery environment and their prevalence during spontaneous fermentations. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 235–239, 2011.

BOKULICH, N. A.; OHTA, M.; RICHARDSON, P. M.; MILLS, D. A. Monitoring Seasonal Changes in Winery-Resident Microbiota. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

BRASIL. Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988. Diário Oficial da União. Brasília, DF. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/1980-1988/L7678.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/1980-1988/L7678.htm)>. Acesso em: 10 jan 2019.

BRASIL. Medida provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/mpv/2186-16.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/mpv/2186-16.htm)>. Acesso em: 10 jan 2019.

BRASIL. Instrução normativa nº 24, de 08 de setembro de 2005. Aprova o Manual Operacional de Bebidas e Vinagres do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Caderno 04. Fermentados Alcoólicos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 20 set.2005. Disponível em: <<http://www.ibrac.net/index.php/servicos/legislacao/191-instrucao-normativa-n-24-de-08-de-setembro-de-2005-do-ministerio-da-agricultura-pecuaria-e-abastecimento>>. Acesso em: 10 jan 2019.

BRASIL. Decreto nº 8.198 de 20 de fevereiro de 2014. Regulamenta a Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 21 fev.2014. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2011-2014/2014/Decreto/D8198.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2014/Decreto/D8198.htm)>. Acesso em: 10 jan 2019.

BRASIL. Decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016. Regulamenta a Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 11 mai.2016. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/CCIVIL\\_03/\\_Ato2015-2018/2016/Decreto/D8772.htm](http://www.planalto.gov.br/CCIVIL_03/_Ato2015-2018/2016/Decreto/D8772.htm)>. Acesso em: 10 jan 2019.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 123, de 04 de novembro de 2016. Dispõe sobre os aditivos alimentares ecoadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em vinhos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 07.nov.2016. Disponível em: <[http://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/24497677/do1-2016-11-07-resolucao-da-diretoria-colegiada-ndc-n-123-de-4-de-novembro-de-2016-24497531](http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/24497677/do1-2016-11-07-resolucao-da-diretoria-colegiada-ndc-n-123-de-4-de-novembro-de-2016-24497531)>. Acesso em: 12 jan 2019.

BRASIL. Instrução normativa nº 14 de 08 de fevereiro de 2018. Estabelece a complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho e Derivados da Uva e do Vinho. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 09 mar. 2018.

DE CASTILHOS, M. B. M.; CORRÊA, O. L. DOS S.; ZANUS, M. C.; et al. Pre-drying and submerged cap winemaking: Effects on polyphenolic compounds and sensory descriptors. Part II: BRS Carmem and Bordô (*Vitis labrusca* L.). **Food Research International**, v. 76, p. 697–708, 2015.

CASTILHOS, M. B. M. **Vinificação em tinto de uvas americanas: efeito das técnicas de pré-secagem das uvas e de chapéu submerso nos perfis químico e sensorial**, 204 f. Tese - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2016.

DE CASTILHOS, M. B. M.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; DEL BIANCHI, V. L.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Isabel red wines produced from grape pre-drying and submerged cap winemaking: A phenolic and sensory approach. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 58–66, 2017.

CHEN, A. C.; SHYU, L. Y.; HSIN, Y. L.; CHEN, K. M.; LAI, S. C. Resveratrol relieves *Angiostrongylus cantonensis* – Induced meningoencephalitis by activating sirtuin-1. **Acta Tropica**, v. 173, n. January, p. 76–84, 2017.

CLAVIJO, A.; CALDERÓN, I. L.; PANEQUE, P. Effect of the use of commercial *Saccharomyces* strains in a newly established winery in Ronda (Málaga, Spain). **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 727–731, 2011.

CLÍMACO, M. C.; D'ABREU, D. C. Influência da origem da madeira de carvalho no envelhecimento de vinhos tintos. **Ciencia e Tecnica Vitivinicola**, v. 23, n. 2, p. 111–117, 2008.

COMITINI, F.; GOBBI, M.; DOMIZIO, P.; et al. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 873–882, 2011.

CRABTREE, H. G. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. p. 8–11, 1929.

DEÁK, T. **Handbook of food spoilage yeasts**. 2 ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008.

DORNELES, D. **Influência do emprego de variedades de *Saccharomyces cerevisiae* na elaboração de vinho tinto de uva terci oriunda do município de Colombo-PR**, 106 f. Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

DORNELES, D.; MACHADO, I. M. P.; CHOCIAL, M. B.; BONFIM, T. M. B. Influence of the use of selected and non-selected yeasts in red wine production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 5, p. 747–751, 2005.

DRUMONDE-NEVES, J.; FRANCO-DUARTE, R.; LIMA, T.; SCHULLER, D.; PAIS, C. Yeast biodiversity in vineyard environments is increased by human intervention. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–13, 2016.

EUTERPIO, M. A.; PAGANO, I.; PICCINELLI, A. L.; RASTRELLI, L.; CRESCENZI, C. Development and validation of a method for the determination of (E)-resveratrol and related phenolic compounds in beverages using molecularly imprinted solid phase extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 8, 2013.

FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; LLOPIS, S.; QUEROL, A.; BARRIO, E. Molecular Identification and Characterization of Wine Yeasts. **Molecular Wine Microbiology**. Espanha: Elsevier, 2011. p.112–141.

FLEET, G. H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 979–995, 2008.

FUKUDA, T.; ODA, K.; HIRAIKE, O. W.; et al. Autophagy inhibition augments resveratrol-induced apoptosis in Ishikawa endometrial cancer cells. **Oncology Letters**, v. 12, n. 4, p. 2560–2566, 2016.

GAENSLY, F.; AGUSTINI, B. C.; DA SILVA, G. A.; PICHETH, G.; BONFIM, T. M. B. Autochthonous yeasts with  $\beta$ -glucosidase activity increase resveratrol concentration during the alcoholic fermentation of *Vitis labrusca* grape must. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 288–295, 2015.

GALLICE, W. C.; MESSERSCHMIDT, I.; PERALTA-ZAMORA, P. Caracterização espectroscópica multivariada do potencial antioxidante de vinhos. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 397–403, 2011.

GAO, F.; DENG, G.; LIU, W.; ZHOU, K.; LI, M. Resveratrol suppresses human hepatocellular carcinoma via targeting HGF-c-Met signaling pathway. **Oncology Reports**, v. 37, n. 2, p. 1203–1211, 2017.

GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU, M.; ATHANASOPOULOS, P.; KYRIAKIDIS, N.; GEROGIANNAKI, I. A.; SPANOS, M. *trans*-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties. **Food Control**, v. 17, n. 9, p. 700–706, 2006.

GILBERT, J. A.; VAN DER LELIE, D.; ZARRAONAINDIA, I. Microbial terroir for wine grapes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 1, p. 5–6, 2014.

GUERRA, C. C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M. C.; CAMARGO, U. A. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2009.

GUILLAMÖN, J. M.; SABATÉ, J.; BARRIO, E.; CANO, J.; QUEROL, A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Archives of Microbiology**, v. 169, n. 5, p. 387–392, 1998.

GÜRBÜZ, O.; GÖÇMEN, D.; DAGDELEN, F.; et al. Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 518–525, 2007.

HASAN, M. M.; BAE, H. An overview of stress-induced resveratrol synthesis in grapes: Perspectives for resveratrol-enriched grape products. **Molecules**, v. 22, n. 2, 2017.

HONG, Y. A.; PARK, H. D. Role of non-*Saccharomyces* yeasts in Korean wines produced from Campbell Early grapes: Potential use of *Hanseniaspora uvarum* as a starter culture. **Food Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 207–214, 2013.

KARIMI DERMANI, F.; SAIDIJAM, M.; AMINI, R.; et al. Resveratrol Inhibits Proliferation, Invasion, and Epithelial–Mesenchymal Transition by Increasing miR-200c Expression in HCT-116 Colorectal Cancer Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 6, p. 1547–1555, 2017.

LI, M.; SCHNEIDER, K.; KRISTENSEN, M.; BORODINA, I.; NIELSEN, J. Engineering yeast for high-level production of stilbenoid antioxidants. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 36827, 2016.

LIMA, U. D. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. D. Tecnologia do vinho. Em: LIMA, U. D. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001. p.21-67.

LIN, S. C.; HO, C. T.; CHUO, W. H.; et al. Effective inhibition of MERS-CoV infection by resveratrol. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2017.

LING, L.; GU, S.; CHENG, Y. Resveratrol activates endogenous cardiac stem cells and improves myocardial regeneration following acute myocardial infarction. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 3, p. 1188–1194, 2017.

LIU, J.; ARNEBORG, NILS; TOLDAM-ANDERSEN, T. B.; PETERSEN, M.A.; BREDIE, W. L. P. Effect of sequential fermentations and grape cultivars on volatile compounds and sensory profiles of Danish wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 11, p. 3594–3602, 2017.

LLEIXÀ, J.; MARTÍN, V.; PORTILLO, M. DEL C.; et al. Comparison of fermentation and wines produced by inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 338, p. 1–12, 2016.

LOMBARDI, S. J.; PANNELLA, G.; IORIZZO, M.; et al. Sequential inoculum of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Saccharomyces cerevisiae* for winemaking Campanino on an industrial scale. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 161, 2018.

MADIGAN, M. T. et al. Eukaryotic Cell Biology and Eukaryotic Microorganisms. In: MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A.; CLARK, D. P. **Brock: Biology of Microorganisms**. Califórnia: Pearson Education, 2012. p.584-612.



MALOVANÁ, S.; GARCIA MONTELONGO, F. J.; PÉREZ, J. P.; RODRIGUEZ-DELGADO, M. A. Optimisation of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 428, n. 2, p. 245–253, 2001.

MANZANARES, P.; VALLÉS, S.; VIANA, F. Non-*Saccharomyces* Yeasts in the Winemaking Process. **Molecular Wine Microbiology**. Espanha: Elsevier, 2011. p.85–111.

MARTÍNEZ-PINILLA, O.; GUADALUPE, Z.; AYESTARÁN, B.; PÉREZ-MAGARIÑO, S.; ORTEGA-HERAS, M. Characterization of volatile compounds and olfactory profile of red minority varietal wines from La Rioja. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 15, p. 3720–3729, 2013.

MARTINIUK, J. T.; PACHECO, B.; RUSSELL, G.; et al. Impact of commercial strain use on *Saccharomyces cerevisiae* population structure and dynamics in pinot noir vineyards and spontaneous fermentations of a canadian Winery. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–19, 2016.

MASNEUF-POMAREDE, I.; BELY, M.; MARULLO, P.; ALBERTIN, W. The genetics of non-conventional wine yeasts: Current knowledge and future challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1563, 2016.

MATTIVI, F.; RENIERO, F.; KORHAMMER, S. Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. **Journal of Agric. and Chem.**, v. 43, p. 1820-1823, 1995.

MELLO, L. M. R. **Panorama da Produção de Uva e Vinho no Brasil**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2017. Comunicado técnico.

MOREIRA, N.; PINA, C.; MENDES, F.; et al. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. **Food Control**, v. 22, n. 5, p. 662–667, 2011.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. **Wine Chemistry and Biochemistry**. Nova Iorque: Springer, 2009.

MUKHERJEE, S.; DUDLEY, J. I.; DAS, D. K. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. **Dose-Response**, v. 8, n. 4, p. 478–500, 2010.

NGUYEN, C.; SAVOURET, J.-F.; WIDERAK, M.; CORVOL, M.-T.; RANNOU, F. Resveratrol, Potential Therapeutic Interest in Joint Disorders: A Critical Narrative Review. **Nutrients**, v. 9, n. 1, p. 45, 2017.

NOUR, V.; TRANDAFIR, I.; MUNTEAN, C. Ultraviolet irradiation of trans-resveratrol and HPLC determination of trans-resveratrol and cis-resveratrol in romanian red wines. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, n. 10, p. 920–927, 2012.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DA VINHA E DO VINHO. Global economic vitiviniculture data. Disponível em: <<http://www.oiv.int/en/oiv-life/2017-world-wine->



production-estimated-at-2467-mhla-fall-of-82-compared-with-2016>. Acesso em: 18 out 2018.

PAWLUS, A. D.; SAHLI, R.; BISSON, J.; et al. Stilbenoid profiles of canes from *Vitis* and *Muscadinia* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 3, p. 501–511, 2013.

PEREIRA G. E.; GUERRA, C. C.; MANFROI, L. A vitivinicultura no semiárido brasileiro. **Vitivinicultura e enologia**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 677-724.

PEREIRA Jr., Nei. **Tecnologia de bioprocessos**. v.1. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008.

PHAM, T.; WIMALASENA, T.; BOX, W. G.; et al. Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery “wild” yeast contaminants. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 4, p. 556–568, 2011.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675–729, 2000.

RAGUSA, A.; CENTONZE, C.; GRASSO, M.; et al. A Comparative Study of Phenols in Apulian Italian Wines. **Foods**, v. 6, n. 4, p. 24, 2017.

RAYMOND EDER, M. L.; REYNOSO, C.; LAURET, S. C.; ROSA, A. L. Isolation and identification of the indigenous yeast population during spontaneous fermentation of Isabella (*Vitis labrusca* L.) grape must. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 532, p. 1–8, 2017.

RIBÉREAU-GAYON, J.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Traité d’oenologie: chimie du vin – stabilisation et traitements**. 5.ed. Paris: DUNOND, 2004. v.2, p.566.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. **The microbiology of wine and vinifications**. 2. ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Ltd, 2006.

RITSCHER, P.; MAIA, J.D.G.; PROTAS, J.F.da S.; GUERRA, C.C.; PEREIRA, G.E.; LIMA, M. dos S. A Viticultura e a Agroindústria de Suco de Uvas Americanas em um Mercado em Crescimento. **Territoires du vin (online)**, n.9, 2018. Disponível em: < <http://preo.u-bourgogne.fr/territoiresduvin/index.php?id=1678>>. Acesso em: 10 fev. 2019.

RIZZON, L. A.; DALL’AGNOL, I. **Vinho tinto**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J.; MANFROI, L. Processo de produção. Em: **Processamento de uva - vinho tinto, grapa e vinagre**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Acidez na vinificação em tinto das uvas Isabel, Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, p. 511–515, 2002.

ROSA, P. M.; MARTINS, L. A. M.; SOUZA, D. O.; QUINCOZES-SANTOS, A. Glioprotective Effect of Resveratrol: an Emerging Therapeutic Role for Oligodendroglial Cells. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 4, p. 2967–2978, 2018.

DA SILVA, G. A. Elaboração de vinhos: Aspectos microbiológicos. Em: **Uva para processamento pós colheita**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.

DA SILVA, L. F.; GUERRA, C. C.; KLEIN, D.; BERGOLD, A. M. Solid cation exchange phase to remove interfering anthocyanins in the analysis of other bioactive phenols in red wine. **Food Chemistry**, v. 227, p. 158–165, 2017.

SILVEIRA, S.V.; HOFFMANN, A.; GARRIDO, L.R. **Produção integrada de uva para processamento: implantação do vinhedo, cultivares e manejo da planta**. v.3. Brasília, DF: Embrapa, 2015a.

SILVEIRA, S.V.; GARRIDO, L.R.; HOFFMANN, A. **Produção integrada de uva para processamento: processos de elaboração de sucos e vinhos, BPA e PPHO**. v.5. Brasília, DF: Embrapa, 2015b.

SOURAL, I.; VRCHOTOVÁ, N.; TŘÍSKA, J.; et al. Various extraction methods for obtaining stilbenes from grape cane of *Vitis vinifera* L. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6093–6112, 2015.

SRIKANTA, A. H.; KUMAR, A.; SUKHDEO, S. V.; PEDDHA, M. S.; GOVINDASWAMY, V. The antioxidant effect of mulberry and jamun fruit wines by ameliorating oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. **Food and Function**, v. 7, n. 10, p. 4422–4431, 2016.

STYGER, G.; PRIOR, B.; BAUER, F. F. Wine flavor and aroma. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1145–1159, 2011.

TANG, L.; YANG, F.; FANG, Z.; HU, C. Resveratrol Ameliorates Alcoholic Fatty Liver by Inducing Autophagy. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 44, n. 06, p. 1207–1220, 2016.

TEIXEIRA, G. J. G.; DA SILVA, P. V.; AGUSTINI, B. C.; DA SILVA, G. A. Discriminação intraespecífica de *Saccharomyces cerevisiae* por RAPD e ISSR. **IV Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**, p. 1–8, 2018.

TIAN, X.; LIU, Y.; REN, G.; et al. Resveratrol limits diabetes-associated cognitive decline in rats by preventing oxidative stress and inflammation and modulating hippocampal structural synaptic plasticity. **Brain Research**, v. 1650, p. 1–9, 2016.

TOALDO, I. M.; CRUZ, F. A.; ALVES, T. D. L.; et al. Bioactive potential of *Vitis labrusca* L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects. **Food Chemistry**, v.

173, p. 527–535, 2015.

TOALDO, I. M.; VAN CAMP, J.; GONZALES, G. B.; et al. Resveratrol improves TNF- $\alpha$ -induced endothelial dysfunction in a coculture model of a Caco-2 with an endothelial cell line. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 36, p. 21–30, 2016.

TŘÍSKA, J.; VRCHOTOVÁ, N.; BALÍK, J.; SOURAL, I.; SOTOLÁŘ, R. Variability in the content of trans-resveratrol, trans- $\epsilon$ -viniferin and  $\gamma$ -viniferin in grape cane of seven *Vitis vinifera* L. varieties during a three-year study. **Molecules**, v. 22, n. 6, 2017.

TRISTEZZA, M.; TUFARIELLO, M.; CAPOZZI, V.; et al. The oenological potential of *Hanseniaspora uvarum* in simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for industrial wine production. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 670, p. 1–14, 2016.

TRISTEZZA, M.; VETRANO, C.; BLEVE, G.; et al. Autochthonous fermentation starters for the industrial production of Negroamaro wines. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 81–92, 2012.

TSAI, C. C.; LEE, M. C.; TEY, S. L.; LIU, C. W.; HUANG, S. C. Mechanism of resveratrol-induced relaxation in the human gallbladder. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–7, 2017.

TSAI, M. H.; HSU, L. F.; LEE, C. W.; et al. Resveratrol inhibits urban particulate matter-induced COX-2/PGE2 release in human fibroblast-like synoviocytes via the inhibition of activation of NADPH oxidase/ROS/NF- $\kappa$ B. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 88, n. 91, p. 113–123, 2017.

VARELA, C.; BARKER, A.; TRAN, T.; BORNEMAN, A.; CURTIN, C. Sensory profile and volatile aroma composition of reduced alcohol Merlot wines fermented with *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 252, p. 1–9, 2017.

VERGARA, C.; VON BAER, D.; MARDONES, C.; et al. Stilbene levels in grape cane of different cultivars in southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 929–933, 2012.

VIGENTINI, I.; MAGHRADZE, D.; PETROZZIELLO, M.; et al. Indigenous georgian wine-associated yeasts and grape cultivars to edit the wine quality in a precision oenology perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 352, p. 1–13, 2016.

VITRAC, X.; BORNET, A.; VANDERLINDE, R.; et al. Determination of stilbenes ( $\delta$ -viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin) in Brazilian wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5664–5669, 2005.

WANG, C.; LIU, Y. Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang, China. **Food Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 172–177, 2013.

WANG, F.; CHATTERJEE, S. Dominant Carbons in trans- and cis-Resveratrol Isomerization. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 121, n. 18, p. 4745–4755, 2017.

WEISKIRCHEN, S.; WEISKIRCHEN, R. Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy? **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 7, n. 4, p. 706–718, 2016.

WU, Y. Y.; XING, K.; ZHANG, X. X.; et al. Influence of freeze concentration technique on aromatic and phenolic compounds, color attributes, and sensory properties of cabernet sauvignon wine. **Molecules**, v. 22, n. 6, 2017.

YAN, X. D.; WANG, Q. M.; TIE, C.; et al. Polydatin protects the respiratory system from PM 2.5 exposure. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–11, 2017.

ZHANG, A. J.; RIMANDO, A. M.; MIZUNO, C. S.; MATHEWS, S. T.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect of resveratrol and piceatannol. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 47, p. 86–93, 2017.

ZOECKLEIN, B. W. et al. **Análisis y producción de vino**. Zaragoza: Editorial Acribia, 2001.